

*DIE BEEINFLUSSUNG DER PHAGOZYTÖSE
NEUTROPHILER GRANULOZYTEN
DURCH CHLOROQUIN (RESOCHIN^R)*

RENATE PÖHLMANN

1981

Dissertations- und Fotodruck ANNELIESE SCHUBERT
Corneliusstraße 21 · 8000 München 5 · Telefon 268177

AUS DER UNIVERSITÄTS-KINDER-POLIKLINIK MÜNCHEN

Direktor: Prof. Dr. H. Spiess

DIE BEEINFLUSSUNG DER PHAGOZYTÖSE NEUTROPHILER
GRANULOZYTEN DURCH CHLOROQUIN (RESOCHIN^R)

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilian-Universität zu München

vorgelegt von
Renate Pöhlmann
aus München

München 1981

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof.Dr.J. SUSCHKE

Mitberichterstatter: Prof.Dr.H. SPIESS

Dekan: Prof.Dr.W. SPANN

Tag der mündlichen Prüfung: 12.2.1981



Herrn Prof. Dr. med. J. Suschke danke ich besonders für die Überlassung des Themas und für die sehr freundliche Unterstützung und wertvolle Beratung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. H. Spiess gilt mein Dank für die Genehmigung des Arbeitsplatzes an der Kinderpoliklinik.

Bei Herrn Dipl. Chem. Dr. R. Wilhelm und bei Frau G. Rode möchte ich mich vor allem für die gute Beratung und die Mithilfe am Gelingen dieser Arbeit bedanken.

Frau Frank und den med.-tech. Assistentinnen des bakteriologischen Labors danke ich ebenfalls für ihre Hilfe.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung	1
2. Charakterisierung von Chloroquin (Resochin ^R)	1
2.1. Chemische Eigenschaften	1
2.2. Pharmakologie	3
2.2.1. Pharmakokinetik	3
2.2.2. Pharmakodynamik	3
2.3. Toxikologie	7
2.4. Klinik	7
3. Problemstellung	7
4. Eigene Untersuchungen	8
4.1. Material und Methode	8
4.1.1. Material — Zusatz: Metachromasie	8
4.1.2. Methode	10
4.1.2.1. Arbeitsablauf	10
4.1.2.2. Beurteilungskriterien	12
4.1.2.3. Zusatz: pH- und Osmolalitätsmessung	14
4.2. Ergebnisse	15
4.2.1. Allgemeines zur Dokumentation	15
4.2.2. Ergebnisse im Einzelnen	16
4.2.3. Zusatz: beobachtete Veränderungen im Blutbild	53
5. Prüfung anderer Pharmaka zum Vergleich	54
5.1. Material und Methode	54
5.2. Ergebnisse	55
6. Diskussion	58
7. Zusammenfassung	67
8. Literaturverzeichnis	68

1. Einleitung

Chloroquin (Resochin^R) wurde 1937 von den deutschen Chemikern ANDERSAG, BREITNER und JUNG synthetisiert, und als Ersatz für das ältere Atebrin als Antimalariamittel eingesetzt (1,37). In der englischen Literatur erschien Chloroquin unter dem Namen Mepacrine erstmals 1951 bei PAGE, der damit an einem Patientenkollektiv mit Lupus erythematoses bzw. mit rheumatoider Arthritis Behandlungen durchführte (44,56). Auch heute noch hat Chloroquin wegen seines anti-inflammatorischen Effektes und seiner relativ milden Nebenwirkungen bei der Therapie der obengenannten Erkrankungen als sogenanntes Basistherapeuticum Bedeutung (28,41).

Über den tatsächlichen Wirkungsmechanismus in vivo gibt es lediglich Vermutungen (27).

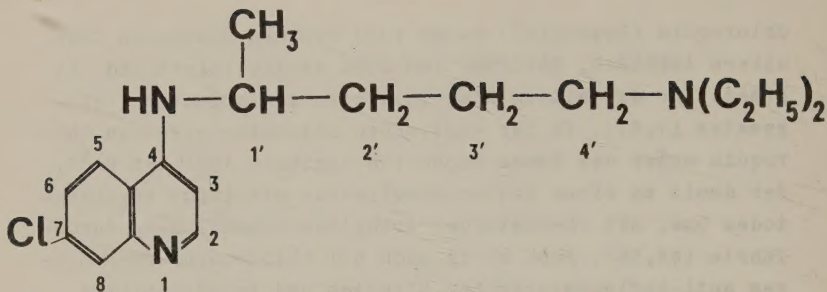
In dieser Arbeit sollen zwei der möglichen, vielleicht ausschlaggebenden Wirkungsweisen von Chloroquin, die bei seinem Einsatz als Antirheumaticum relevant sein könnten, untersucht werden.

2. Charakterisierung von Chloroquin (Resochin^R)

2.1. chemische Eigenschaften

Chloroquin ist ein Derivat des 4-Amino-chinolins (37). In dieser Arbeit wurde Resochin^R von der Firma BAYER verwendet. Eine Ampulle enthält in 5ml 5%iger Lösung 0,25g 7-Chlor-4 (4'-diaethylamino-1'-methylbuthylamino)-chinolin-diphosphat (=Chloroquindiphosphat), entsprechend 0,15g Chloroquinbase.

Strukturformel (32)



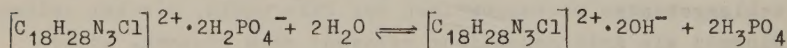
Chloroquinbase: $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{Cl}$

MG: 319,88

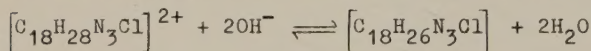
Chloroquindiphosphat: $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{Cl} \cdot 2\text{H}_3\text{PO}_4$

MG: 516 (35)

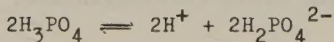
In wäßriger Lösung liegt Chloroquindiphosphat als Ammoniumsalz in einer Ionenbindung vor.



Für die Chloroquinbase gilt das Gleichgewicht:



Im allgemeinen reagieren Ammoniumsalze in wäßriger Lösung sauer. Da aber Chloroquin als schwache Base bezeichnet wird, (45), und Phosphorsäure als schwache Säure bekannt ist, müßte das Salz neutral reagieren (23). Phosphorsäure ist, bezogen auf eine 1N Lösung, zu weniger als 10% dissoziiert (23). Für die Verbindung mit der Chloroquinbase ist deshalb die erste der drei Dissoziationsstufen mit $\text{pK}_s = 2,13$ maßgebend:



Einer annähernd neutralen Reaktion widersprach jedoch die eigene pH-Messung der Chloroquinlösung mittels Mikro-ASTRUP, bei der sich ein pH von 4,46 ergab.

Auf den pH-Wert im Blut nach Chloroquinzufuhr wird später bei den Versuchen eingegangen.

Zur Berechnung der in den Versuchen benutzten Dosen ist die Molarität der Ausgangslösung wichtig. Sie errechnete sich mit $4,844 \cdot 10^{-4} \text{M}$, bezogen auf eine Ampulle Chloroquindiphosphatlösung.

2.2. Pharmakologie

Im folgenden soll auf die pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Wirkungsweisen von Chloroquin (Resochin^R), soweit sie bekannt sind, eingegangen werden.

2.2.1. Pharmakokinetik

a) Resorption:

Orale Gaben von Chloroquin werden leicht resorbiert (37). Chloroquinlösung wird i.m. oder langsam i.v. appliziert.

b) Distribution:

50-60% des Pharmakon werden an die Plasmaproteine gebunden (37), jedoch betragen die Konzentrationen im Gewebe wie Leber, Lunge, Milz, Niere, Muskel, Knochen und in den neutrophilen Granulozyten das 200-700fache der Plasmakonzentration (16,44). Ebenso wird Chloroquin in melaninhaltigem Gewebe akkumuliert (44), und in die Cornea eingelagert (61).

c) Exkretion:

Chloroquin wird sehr langsam über mehrere Wochen hinweg zu 70% in unveränderter Form über die Nieren ausgeschieden (44). An anderer Stelle wurde die renale Ausscheidung mit 10-20% angegeben (37).

2.2.2. Pharmakodynamik

a) biologische Wirkung:

Latenz: mehrere Monate bis zu 1 1/2 Jahren bei täglicher Dosis von 0,25g Chloroquin (27,32).

Dauer: Die Rheumatherapie ist bekanntlich immer eine Langzeittherapie (41). Beginn und Ende der Chloroquinwirkung sind verzögert, zeitlich nicht genau festzulegen und stark patientenabhängig (41).

Für Chloroquin als Antimalariamittel gelten andere Maßstäbe, auf die hier nicht eingegangen werden soll.

b) Wechselwirkung zwischen Pharmakon und Bestandteilen des biologischen Systems.

Folgender Abschnitt soll, als Grundlage dieser Arbeit, besondere Beachtung finden.

zelluläre Bestandteile:

Chloroquin soll die Phagozytose hemmen und die Lysosomen stabilisieren (Sekundärwirkung) (36,41), indem es zuerst in einer energieunabhängigen Reaktion in der fettlöslichen, monoprotinierten Form von der Zellmembran aufgenommen wird, und in einem zweiten, energieabhängigen Schritt im sauren Cytoplasma in die doppeltprotonierte Form übergeht, um dann in den Lysosomen zu akkumulieren (Primärwirkung) (26). Dieser Aktionsablauf wurde unter verschiedenen Versuchsbedingungen in vitro und in vivo an Erythrozyten, Fibroblasten, Leberzellen und neutrophilen Granulozyten geprüft (10,12,26,58,68). Zur Prüfung der Akkumulationsfähigkeit dienten isolierte Lysosomen (45). Die Bindung von Chloroquin an die Zellmembran ist reversibel, da die initiale Aufnahme durch HANK-Lösung, eine isotone Elektrolytlösung, herabgesetzt werden kann (12). In der Diskussion wird nochmal darauf eingegangen, da diese Lösung auch bei den eigenen Versuchen Anwendung fand.

Als Indikatoren einer Phagozytosehemmung wurden in anderen Arbeiten häufig Hefezellen, Zymosanpartikel oder J^{131} -SHA benutzt. Mit ^{14}C -Chloroquin konnte recht deutlich an Fibroblastenkulturen die Aufnahme und Verteilung im Cytoplasma gemessen werden (12).

Auch bei den in geringerem Umfang vorhandenen in vivo Untersuchungen an Patienten mit primär-chronischer Polyarthrit

oder mit systematischem Lupus erythematodes konnte man eine Hemmung der Phagozytoseleistung neutrophiler Granulozyten feststellen (34,60).

Chloroquin als Antimalariamittel:

Hier zeigte sich ein ähnlicher Effekt wie er oben beschrieben wurde (14). Die Aufnahme in infizierte Erythrozyten erfolgt in einer schnellen Oberflächenabsorption und einer anschließenden langsamen Pinozytosephase (43).

Weitere Wechselwirkungen:

Für eine immunsuppressive, und dadurch antirheumatische Wirkung des Chloroquin wird seine Proliferations- und Granulationshemmung verantwortlich gemacht (36,49), wodurch z.B. bei rheumatoider Arthritis nach Phagozytose der Immunkomplexe durch die Synovialzellen die Freisetzung von Kollagenase und Kathepsin-D, die für den weiteren Krankheitsverlauf bedeutend sind, verhindert werden könnte (2,28). Andererseits zeigte Chloroquin keinen günstigen Effekt auf den Kollagenmetabolismus, weil es die Kathepsinaktivität im Serum sogar erhöhen soll (18). Für eine Immunsuppression spricht, daß Chloroquin mit der 2-Amino-Gruppe der DNA Komplexe bilden (18) und so die DNA-Synthese und -Reparatur hemmen kann (29).

Prostaglandinantagonismus:

Diese Eigenschaft des Chloroquin hat man sich bei der Therapie von Patienten mit Ductus arteriosus zunutze gemacht (11). Allerdings soll es auch ein schwacher Prostaglandinagonist sein (35).

Hemmung der Chemotaxis:

Dadurch soll ebenfalls der Phagozytose von Rheumafaktoren im Komplex mit Gammaglobulinen (IgG) und einer ständigen Aktivierung der Zellen durch diese Immunkomplexe entgegengewirkt werden (6,25,40). Ähnliche Reaktionen werden bei systematischem Lupus erythematodes vermutet. Diese medikamentöse Einflußnahme ist sicher nur im Anfangsstadium der Krankheit relevant. Es wurde nämlich festgestellt, daß bei z.T. unbehandelten, z.T. symptomatisch behandelten Rheuma-

patienten die Chemotaxis der Granulozyten, korrelierend mit einem reduzierten Komplementserumwert, geschwächt war (38, 47), und damit die ansteigende Anfälligkeit dieser Patienten gegenüber Infektionen begründet wurde (38). In diesem Sinn könnte dann wiederum eine komplementfördernde Komponente, die dem Chloroquin anderweitig zugeschrieben wurde, therapeutischen Wert besitzen (17).

Eine neuere Studie weist auf eine Aktivierung der adrenocorticalen Funktion durch Chloroquin hin (21).

Bedeutung der Ionisation von Chloroquin:

Da das Medikament als Ammoniumsalz vorliegt, muß auch an seine Wechselwirkung mit der Zellmembran über elektrostatische Kräfte gedacht werden. Auf einen Einfluß des Chloroquin auf den Elektrolythaushalt der phagozytierenden Zelle wies BAKER (5) hin, der eine Reduktion des K^+ -Eintrittes und des totalen K^+ -Zellgehaltes im Zusammenhang mit der Phagozytosehemmung feststellte.

c) Im Gegensatz zu den, bezüglich der Phagozytose beschriebenen Vorgängen sind auch Untersuchungen bekannt, bei denen keinerlei Auswirkung des Chloroquin auf phagozytierende Zellen beobachtet werden konnte (1,69).

d) Dosis

Die therapeutische Einzeldosis bei Verwendung als Antirheumaticum liegt bei 250mg/die für Erwachsene und bei 4mg/kg/die für Kinder (33).

Bei Malaria erhöht sich die parenterale Chloroquineinzeldosis auf 0,2ml/kg, bezogen auf 50kg Körpergewicht.

Im ersten Fall soll die Dosis niedriger liegen, da die Medikation über lange Zeit erfolgt, und zwischen Wirkungen und unerwünschten Nebenwirkungen abgewägt werden muß.

Den eigenen Untersuchungen wurde die zweitgenannte Dosis zugrunde gelegt, weil es sich hier um kurzfristige in vitro Versuche handelt. Nachfolgend soll der Bezug zur Langzeittherapie diskutiert werden.

2.3. Toxikologie

Die Nebenwirkungen der Chloroquinbehandlung sind zum größten Teil nicht schwerwiegend, und nur von 10% der Patienten wird die Therapie überhaupt nicht vertragen (32). Am häufigsten treten gastrointestinale Störungen und Arzneimittlexantheme auf (56). Beachtung gilt jedoch den reversiblen Hornhautveränderungen, wobei wahrscheinlich Chloroquin oder seine Oxidationsprodukte in der Cornea abgelagert werden können, aufgrund des dort vorhandenen hohen Anteils an Chondroitinschwefelsäure und an Keratansulfat (20). Dabei besteht keine Beziehung zwischen verabreichter Gesamtdosis und Keratopathie. Dagegen stellt die, hauptsächlich von der Tagesdosis abhängige Retinopathie ein ernstes Problem dar (44,56).

Über LD_{50} und ED_{50} , bzw. über die therapeutische Breite des Chloroquins sind keine Zahlen bekannt.

2.4. Klinik

Chloroquin (Resochin^R) wird zur Therapie der primär-chronischen Polyarthritidis, des systematischen Lupus erythematoses und der Sarkoidose (M.Boeck) (42,56), sowie bei anderen Autoimmunkrankheiten (25) eingesetzt.

Außerdem hat es seine ursprüngliche Bedeutung bei der Prophylaxe und Therapie der Malaria beibehalten.

3. Problemstellung

Inhalt der vorliegenden Arbeit ist, die unter anderem bereits erwähnten Eigenschaften des Chloroquin (Resochin^R) als Phagozytosehemmer und Lysosomenstabilisator an neutrophilen Granulozyten mit in vitro Versuchen zu prüfen.

4. Eigene Untersuchungen

4.1. Material und Methode

4.1.1. Material

Blut: Von zwölf gesunden Erwachsenen wurde ca. 14ml Venenblut gewonnen, und mit 10 I.E., entsprechend 2, μ l Liquemin^R/ml Blut heparinisiert.

Bakterien: Als Indikatoren der Phagozytose wurden Entero kokken (*Streptococcus faecalis*, Gruppe D) verwendet (67), die ca. 18 Stunden bei 37°C in einer Standard-II-Nährbouillon (Fa. MERCK) gezüchtet worden waren. Diese Bakterienart schien für die Versuche vorteilhaft zu sein, da die Zellwand gram-positiver Bakterien empfänglicher für den Angriff des Lysozyms ist (15), und deshalb wiederum eine eventuelle Lyso-somenstabilisierung deutlicher beurteilt werden könnte.

Medikament: Resochin^R von der Firma BAYER.

HANK-Lösung: Diese isotone Elektrolytlösung diente zum Waschen des Blutes.

Fluoreszenzmikroskop: Damit wurden die neutrophilen Granulozyten in den Blutausstrichen beurteilt.

Aufbau und Funktion des Fluoreszenzmikroskopes finden sich ausführlich in einer früheren Arbeit (48).

Farbstoff: $2,5 \cdot 10^{-4}$ M Pseudoisocyaninchlorid-Lösung.

Zusatz: Erläuterung von Metachromasie und Pseudoisocyaninchlorid (PIC)

Man versteht unter Metachromasie die durch Wechselwirkung von Farbstoffmolekülen untereinander (Aggregation) entstandenen Veränderungen der Absorption, bei gleichzeitiger Adsorption an feste bzw. bewegliche Matrizen (54). Natürlich vorkommende Matrizen (Chromotrope) können Heparin, Hyaluronsäure, Sulfatide oder Nukleinsäuren bzw. deren Anionen (SO_4^- , COO^- , H_2PO_4^-) sein. Bei dem leicht löslichen Salz

Sind die Gegenionen (Anionen) der oben genannten Matrizen entsprechend dem Abstand der Moleküle im Farbstoffaggregat lokalisiert, so tritt diese Aggregation schon bei um Zehnerpotenzen niedrigeren Farbstoffkonzentrationen auf. Bei den eigenen Versuchen ist daher statt einer $2 \cdot 10^{-2} \text{M}$ konzentrierten PIC-Lösung nur eine $2,5 \cdot 10^{-4} \text{M}$ Lösung notwendig, um Fluoreszenz zu erreichen, bzw. um Polyanionen in Blutaussstrichen nach Fixierung und Färbung mit der verdünnten Lösung sichtbar zu machen (59). Die Absorptionsbande der Matriz-PIC-Aggregate liegt im Bereich der J-Bande, je nach Chromotrop zwischen 574-564nm. Untersuchungen zeigten, daß es sich tatsächlich um Metachromasie und keine Salzbildung handelte, und daß ferner die Bildung der J-Aggregate an die Gegenwart von Wasser gebunden ist (52).

4.1.2. Methode

4.1.2.1. Arbeitsablauf

Pro Versuch wurde das Venenblut zu je 1,75ml auf acht silikonisierte Röhrchen verteilt, und mit 2000 Upm fünf Minuten lang zentrifugiert.

Wie schon gesagt (2.2.1.), wird Chloroquin (Resochin^R) im Blut zum großen Teil an Plasmaproteine gebunden. Um diese Bindung zu vermeiden, wurden die acht Proben in zwei Gruppen eingeteilt. Bei der ersten wurde das Plasma nach dem Zentrifugieren abpipettiert, bei der anderen nach Entfernung des Plasmas eine dreimalige Waschung mit ca. jeweils 2ml HANK-Lösung angeschlossen. Das Plasma wurde aufbewahrt. Zur Überprüfung der Effizienz dieser Vorbehandlung wurden zusätzlich zwei Versuche im Vollblut durchgeführt.

Der folgende Abschnitt betrifft die Medikation. Chloroquin sollte in seiner therapeutischen, fünffachen und zehnfachen therapeutischen Dosis geprüft werden. Die zehnfache Dosis wurde in Anlehnung an frühere Experimente über Chemothera-

pie gewählt (64,65), unter dem Aspekt eines möglichen in vitro - in vivo Vergleiches. Die fünffache therapeutische Dosis wurde willkürlich als Zwischenwert gewählt.

Da das Blutvolumen eines Erwachsenen mit 6,5-7,5% vom Körpergewicht angegeben wird (55), ergab sich, bezogen auf 50kg Körpergewicht und 0,2ml Chloroquin/kg, die therapeutische Dosis mit 5 μ l/1,75ml Blut ($4,84 \cdot 10^{-7}$ M Chloroquindiphosphat). Entsprechend konnte die fünffache therap. Dosis mit 25 μ l ($2,42 \cdot 10^{-6}$ M), und die zehnfache therap. Dosis mit 50 μ l ($4,84 \cdot 10^{-6}$ M), bezogen auf 1,75ml Blut, berechnet werden.

Die vierte Probe diente als Kontrolle.

Anschließend wurden die acht Proben 20 Minuten lang bei 37°C in einem Schüttelwasserbad inkubiert. Diese Einwirkungszeit des Chloroquin auf die neutrophilen Granulozyten wurde willkürlich gewählt.

Um ein gutes Mittelmaß an phagozytierten Bakterien zu erhalten, sollte das Verhältnis Enterokokken : neutrophilen Granulozyten auf 5:1 eingestellt werden. Dazu wurde die bakterienhaltige Bouillon mit 0,9%iger NaCl-Lösung auf 1:100 verdünnt, und im Phasenkontrastmikroskop (67) mittels einer Neubauerkammer ausgezählt. Nach Umrechnung auf ml Bouillon ergab sich ein Durchschnittswert aller Zählungen von $193 \cdot 10^6$ Enterokokken/ml (Spannweite: $122-288 \cdot 10^6$). Mit derselben Zählkammer wurde die Granulozytenzahl ermittelt. Der Gesamtdurchschnitt lag bei 5885 Granulozyten/ μ l Blut (Spannweite: 3538-8375 Gran./ μ l Blut).

Im Versuchsansatz wurden durchschnittlich 267 μ l Bakterienbouillon verwendet (Spannweite: 160-400).

Hiermit ergab sich das Verhältnis:

$51531 \cdot 10^3$ Enterokokken : $10298 \cdot 10^3$ Granulozyten = 5 : 1

Es ist bekannt, daß beim Phagozytosevorgang der Granulozyten chemotaktische Substanzen aus dem Serum bzw. Plasma (Komplementsystem, bestimmte Enzyme und andere humorale

Stoffe) vorhanden sein müssen (15,39). Bei der Anlagerung der Bakterien an die Zellmembran und der Pseudopodienbildung der Zelle sind außerdem sogenannte Opsonine erforderlich (39). Um bei den eigenen Versuchen diese Voraussetzungen zu schaffen, wurde nach der Chloroquinbehandlung allen Blutproben gleichzeitig mit der entsprechenden Bakterienmenge das gesamte, vorher entfernte Plasma wieder zugeführt.

Nach einer weiteren Inkubationsdauer von 45 Minuten, die aufgrund von Ergebnissen einer früheren Arbeit (48) für eine maximale Phagozytose geeignet erschien, wurden Blutausstriche angefertigt.

Färbung:

Die luftgetrockneten Ausstriche wurden mit Methanol(CH_3OH) drei Minuten lang fixiert und getrocknet. Pseudoisocyaninchloridlösung ($5 \cdot 10^{-4}\text{M}$) wurde durch Mischen mit einer Pufferlösung $\text{pH}=8,0$ (MERCK 9460) im Verhältnis 1:1 auf eine $2,5 \cdot 10^{-4}$ molare Lösung eingestellt. Nach einer Reaktionszeit von 30 Minuten wurden die Ausstriche getrocknet und im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

Aufgrund der Eigenschaft von PIC, die eine optimale Fluoreszenz nur bei Anwesenheit von Wasser erlaubt (52), wurden die Ausstriche sofort nach Beendigung der Färbung beurteilt.

4.1.2.2. Beurteilungskriterien des Granulozyten

Pro Blutausstrich wurden 100 neutrophile Granulozyten nach verschiedenen Kriterien beurteilt.

a) Phagozytoseindex (PI) = phagozytierende Granulozyten / 100 ausgezählte Granulozyten.

Es wurde festgestellt, ob der Granulozyt überhaupt phagozytiert hatte oder nicht. In einer anderen Arbeit verstand man unter PI die genaue Bakterienzahl/Zelle (63).

b) Kriterien des phagozytierenden Granulozyten:

Der Menge phagozytierter Bakterien wurden die zwei Kategorien "über fünf Bakterien" und "unter fünf Bakterien" zugeordnet, und die Ergebnisse in %Werten der Phagozytose (PI) ausgedrückt.

Da man infolge unterschiedlicher Fluoreszenz hellgelb-leuchtende Bakterien, die sich in intaktem Zustand befanden, von schwach gelbgrünlich fluoreszierenden Kokken, die schon von lysosomalen Enzymen angegriffen worden waren, differenzieren konnte, wurde eine weitere Einteilung der phagozytierten Enterokokken vorgenommen:

intakte	}	Enterokokken	(Angabe in % von PI)
intakte + defekte			
defekte			

Normalerweise fusionieren bei einem neutrophilen Granulozyten zuerst die spezifischen oder sekundären Granula mit dem Phagosom, die hier mikroskopisch eine grüne Fluoreszenz aufwiesen, und erst im Anschluß daran die azurophilen oder primären Granula (hier gelb sichtbar) (46). Zur Beurteilung der Granulierung schien eine dreiteilige Gruppierung sinnvoll, wie sie auch von HIRSCH (24) vorgenommen wurde, da sich eine Einzelzählung der Granula wegen der begrenzten mikroskopischen Vergrößerung als ungenügend erwiesen hätte. Die Unterteilung geschah wie folgt:

(+) = wenige	}	Granula
+ = mittelmäßig viele		
++ = sehr viele		

Vorhandene Granulierung, die als Gesamtgranulierung bezeichnet wurde, diente als der 100% Wert, um die Granulauntergruppen prozentual auszudrücken.

c) Nicht-phagozytierende Granulozyten

Diesen Zellen kam dieselbe Bewertung der Granulierung, wie oben aufgeführt, zu.

d) Insgesamt erfolgte die Auszählung nach dem beschriebenen Schema bei zehn Versuchsreihen mit achzig Blutaussstrichen. Die zwei Vollblutversuche wurden gleichermaßen ausgewertet.

4.1.2.3. Zusatz: pH- und Osmolalitätsmessungen

a) pH-Messung:

Frühere Experimente hatten gezeigt (12), daß eine Verschiebung des physiologischen pH-Wertes (=7,4) um 0,3 pH-Einheiten ins Saure, bezüglich des Kulturmediums, zur Folge hatte, daß weniger Chloroquin an der Zelloberfläche der in jenem Fall geprüften Fibroblasten adsorbiert wurde, und weniger in den Intracellulärraum gelangte.

Da sich bei der eigenen pH-Messung der Chloroquinlösung ein saurer pH-Wert (=4,46) herausgestellt hatte, mußte bei den Versuchen auf einen eventuellen pH-Einfluß geachtet werden. Deshalb wurde während verschiedener Phasen des Versuchsablaufes geprüft, ob sich trotz der relativ geringen Chloroquindosen der pH-Wert des untersuchten Blutes bedeutend ändern würde.

b) Osmolalitätsmessung:

In einem gesonderten Ansatz wurden nach 20minütiger Inkubationszeit von Vollblutproben, behandelt mit den drei verschiedenen Chloroquindosen, und nach anschließender Zentrifugation die Osmolalitäten im Plasma mittels Gefrierpunkts-erniedrigung gemessen, und mit dem Kontrollwert verglichen. Diese Messung schien notwendig, um eine Änderung der Osmolalität einmal durch das Medikament selbst oder andererseits infolge seines, auf den K^+ -Haushalt des Granulozyten reduzierend wirkenden Einfluß während der Phagozytose festzustellen (5). Bekanntlich stellt auch die Oberflächen-spannung des Granulozyten einen wichtigen Punkt für seine Phagozytoseleistung dar (7).

4.2. Ergebnisse

4.2.1. Allgemeines zur Dokumentation

Von den jeweiligen zehn Ergebnissen wurden die Mittelwerte gebildet, und als Streuungsmaß die empirische Standardabweichung berechnet (50). Da die Angabe eines diskreten Merkmals nur ganzzahlig sinnvoll ist (31), wurden die Mittelwerte auf- bzw. abgerundet.

Die graphische Darstellung erfolgte in Form von Blockdiagrammen (31).

Um eine präzisere Aussage zu treffen, wurde eine statistische Auswertung nach Rücksprache mit dem INSTITUT für STATISTIK und BIOMATHEMATIK des Klinikums Großhadern angeschlossen.

a) Rangvarianzanalyse mit dem FRIEDMAN-Test: parameterfreier Vergleich abhängiger Stichproben (4,31,51)

Der FRIEDMAN-Test ist ein Homogenitätstest. Es wird festgestellt, ob die verschiedenen Versuchsbedingungen (Kontrolle ohne Medikament, therapeutische Dosis, fünffache und zehnfache therapeutische Dosis) einen systematischen Einfluß auf die Meßwerte nehmen ($=H_1$: Alternativhypothese) oder nicht ($=H_0$: Nullhypothese). Dazu werden die genannten Gruppen in Blöcke zusammengefaßt, mittels einer Rangliste verglichen, und durch einen CHI-Quadratwert ausgedrückt, der größer als die tabellarische Prüfgröße sein muß, um als signifikant zu gelten.

Als Signifikanzniveau wurde $P=0,01$ festgelegt.

b) Multiple Vergleiche nach WILCOXON und WILCOX (51)

Mit dem, sich direkt an a) anschließenden Test soll geprüft werden, welche Differenzen sich beim Vergleich der Kontrolle und der verschiedenen Dosen untereinander ergeben, und ob sie die tabellierte Differenz erreichen oder übertreffen, und dadurch signifikant sind.

Signifikanzniveau: $P=0,01$ bzw. $0,05$

c) WILCOXON matched-pairs signed rank test: nichtparametrischer Test für paarige Stichproben (31,51)

Dieser Test soll zeigen, ob Paardifferenzen der gleichen Grundgesamtheit entstammen ($=H_0$), oder ob ihnen unterschiedliche Verteilungen zugrunde liegen ($=H_1$). Im letzten Fall muß der errechnete Wert unter dem sogenannten Schwellenwert liegen.

Paardifferenzen zeigten sich bei allen Versuchen zwischen gewaschenen und nicht-gewaschenen Blutproben, sollten aber nur beim Kriterium des Phagozytoseindex, da sie dort eine eindeutige und gleichförmige Tendenz zeigten, mit dem WILCOXON-Test geprüft werden.

Die Effizienz des Testes liegt bei 95% d.h. $P=0,05$ (51)

4.2.2. Ergebnisse im Einzelnen

a) Phagozytoseindex

Es ergab sich eine Phagozytosehemmung der neutrophilen Granulozyten in Korrelation mit ansteigender Chloroquindosis. Sie war bei den nicht-gewaschenen Versuchsreihen stärker ausgeprägt als bei den gewaschenen, mit dem größten Unterschied nach zehnfacher therapeutischer Dosierung.

Tab.1
Phagozytose-
index der
gewaschenen
Versuchsreihe

Vers.- Nr.	Kon- trolle	therap. Dosis	5fache th. D.	10fache th. D.
1	81	81	64	77
2	87	79	60	51
3	75	76	70	38
4	93	75	70	46
5	72	59	45	46
6	82	84	72	55
7	77	75	59	49
8	67	69	57	42
9	69	69	54	38
10	58	60	56	22
$\bar{x}$	76	73	61	46
$\pm s$	10,2	8,4	8,4	14,1

Tab.2

Phagozytose-
index der
nicht-ge-
waschenen
Versuchsreihe

Vers.- Nr.	Kon- trolle	therap. Dosis	5fache th. D.	10fache th. D.
1	71	74	63	43
2	72	74	50	16
3	82	70	48	8
4	96	80	63	31
5	62	57	53	27
6	86	85	54	26
7	68	68	58	30
8	71	64	56	38
9	77	55	43	32
10	60	54	42	11
$\bar{x}$	75	68	53	26
$\pm s$	11,0	11,0	7,4	12,6

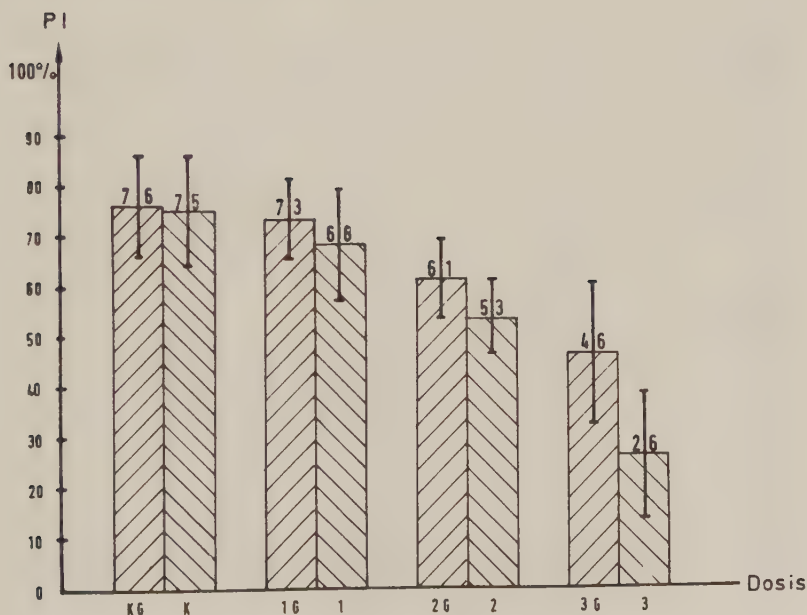


Abb.2 Phagozytoseindex der neutrophilen Granulozyten
K=Kontrolle, 1=therap.Dosis, 2=fünffache th.Dosis
3=zehnfache th.Dosis, G=gewaschen, I=Standardabw.

RAUWÄRMEDÄMMVERFAHREN (VERLEHMBÄNNE) (14.03.1988)

CHARAKTERISTIKEN MITGELIEFERT VON KUNDENSTÜCKEN (STÜCKLISTEN)

ANZAHL DER BLÖCKE: $n = 10$ TYP: B BLOCK: 1 H: 1
ANZAHL DER STÜCKPROBEN: $k = 4$ PROBE: DER STÜCKPROBEN

EINHEIT DER WERT: BLOCKWERT EINHEIT DER WERT: BLOCKWERT

BLOCK 1	PROBE	BLOCK 1	PROBE
81	2,5	74	1
81	2,5	74	4
64	1	63	2
77	3	40	1
BLOCK 2	RANG:	BLOCK 2	RANG:
87	4	72	3
79	3	74	4
60	1	50	2
51	1	16	1
BLOCK 3	RANG:	BLOCK 3	RANG:
75	3	32	4
76	4	70	3
70	2	49	2
38	1	2	1
BLOCK 4	RANG:	BLOCK 4	RANG:
93	4	90	4
75	3	84	3
70	2	63	2
46	1	31	1
BLOCK 5	RANG:	BLOCK 5	RANG:
72	4	63	4
59	3	52	3
45	1	50	2
46	2	77	1
BLOCK 6	RANG:	BLOCK 6	RANG:
82	3	86	4
84	4	85	3
72	2	54	2
55	1	34	1
BLOCK 7	RANG:	BLOCK 7	RANG:
77	4	38	3,5
75	3	68	4,5
59	2	50	2
49	1	30	1
BLOCK 8	RANG:	BLOCK 8	RANG:
67	3	71	4
69	4	64	3
57	2	56	2
42	1	28	1
BLOCK 9	RANG:	BLOCK 9	RANG:
69	3,5	72	4
69	3,5	58	3
54	2	40	2
38	1	32	1
BLOCK 10	RANG:	BLOCK 10	RANG:
58	3	60	4
60	4	54	3
56	2	43	2
22	1	11	1

NGSUMME 1 = 15
NGSUMME 2 = 35
NGSUMME 3 = 18
NGSUMME 4 = 12

RANGSUMME 1 = 37,5
RANGSUMME 2 = 32,5
RANGSUMME 3 = 20
RANGSUMME 4 = 18

I-QUADRAT (FRIEDMAN) = 25,59183673

NDUNGEN SIND KORRIGIERT

EIHEITSGRADE= 3

RNUNG: CHI-QUADRATVERTEILUNG UNSICHER

NTL SCHWELLENWERTE NACH MICHAELIS (TAB.18) IM ANHANG

CHI-QUADRAT (FRIEDMAN) = 25,59183673
EINGANGEN SIND KORRIGIERT
FREIHEITSGRADE = 3

FRIEDMAN-Test: Schwellenwert = 10,53 (P=0,01)

28,0 > 10,53 für nicht-gewaschene

25,5 > 10,53 für gewaschene

} Stichproben

Da die Prüfgröße größer als das Quantil ist, entstammen die Kontrollen und die Chloroquin-behandelten Stichproben verschiedenen Grundgesamtheiten.

MULTIPLE VERGLEICHE NACH WILCOXON UND WILCOX

STICHPROBEN	RANGDIFFERENZEN
1 - 2	5
1 - 3	17,5
1 - 4	37,5
2 - 3	12,5
2 - 4	22,5
3 - 4	10

KRITISCHE RANGDIFFERENZ SIEHE TAB. 187 IM ANHANG

MULTIPLE VERGLEICHE NACH WILCOXON UND WILCOX

STICHPROBEN	RANGDIFFERENZEN
1 - 2	0
1 - 3	17
1 - 4	23
2 - 3	17
2 - 4	20
3 - 4	6

KRITISCHE RANGDIFFERENZ SIEHE TAB. 187 IM ANHANG

WILCOXON-WILCOX-Test:

kritische Rangdifferenz: 18,0 (P=0,01)

27,5 > 18,0 für nicht-gewaschene }
23,0 > 18,0 für gewaschene } Stichproben

Es besteht Signifikanz zwischen Kontrollen und zehnfachen therapeutischen Dosiswerten.

22,5 > 18,0 für nicht-gewaschene }
23,0 > 18,0 für gewaschene } Stichproben

Die Ergebnisse mit zehnfacher therapeutischer Dosis unterscheiden sich signifikant von denen mit therapeutischer Dosis.

WILCOXON MATCHED-PAIRS SIGNED-RANKS TEST

VERGLEICH ZWEIER ABHÄNGIGER STICHPROBEN.

WERTEPAARE MIT NULL-DIFFERENZEN NICHT EINGEBEN.
ANZAHL DER EINZUGEBENDEN WERTEPAARE

10

EINGABE DER WERTEPAARE (1PAAR/ZEILE)

71	81
72	87
82	75
96	93
62	72
86	82
68	77
71	67
77	69
60	58

FALLZAHL:

N= 10

RANGSUMMEN:

R(+) = 21 R(-) = 34

R-WERT = 21

BINDUNGEN SIND NICHT KORRIGIERT

ANZAHL DER BINDUNGEN = 1

WILCOXON MATCHED-PAIRS SIGNED RANK TEST

VERGLEICH ZWEIER ABHAENGIGER STICHPROBEN.

WERTEPAARE MIT NULL-DIFFERENZEN NICHT EINGEBEN.
ANZAHL DER EINGEGEBENEN WERTEPAARE

10

EINGABE DER WERTEPAARE (1. PAAR ZEILE)

74	81
74	79
70	76
80	75
57	59
85	84
68	75
64	69
55	67
54	60

FALLZAHL:

N= 10

RANGSUMMEN:

R(+)= 5 R(-)= 50

R-WERT= 5

BINDUNGEN SIND NICHT KORRIGIERT

ANZAHL DER BINDUNGEN= 3

WILCOXON MATCHED-PAIRS SIGNED RANK TEST

VERGLEICH ZWEIER ABHAENGIGER STICHPROBEN.

WERTEPAARE MIT NULL-DIFFERENZEN NICHT EINGEBEN.
ANZAHL DER EINGEGEBENEN WERTEPAARE

10

EINGABE DER WERTEPAARE (1. PAAR ZEILE)

63	64
50	60
48	70
63	70
53	45
54	72
58	59
56	57
43	54
42	56

FALLZAHL:

N= 10

RANGSUMMEN:

R(+)= 5 R(-)= 50

R-WERT= 5

BINDUNGEN SIND NICHT KORRIGIERT

ANZAHL DER BINDUNGEN= 1

HYPOTHESE=2

WILCOXON-MATCHED-PAIRS-SIGNE-EDGED-TEST

VERGLEICH TWELER ABHÄNGIGER ZUFÜHRUNGEN

WERTEPAARE MIT NULL-DIFFERENZEN NICHT EINGEBEN
ANZAHL DER EINGEGEBENEN WERTEPAARE

10
EINGABE DER WERTEPAARE (1PAAR/ZEILE)

40	77
16	51
8	38
31	45
27	46
26	50
30	49
38	47
32	49
11	27

FALLZAHL:

N= 10

RANGSUMMEN:

R(+)= 0 R(-)= 55

R-WERT= 0

BINDUNGEN SIND NICHT KORRIGIERT

ANZAHL DER BINDUNGEN= 1

WILCOXON-Paardifferenzentest:

Der kritische Tabellenwert beträgt: R= 8 (P=0,05)

	Prüfgröße	Signifikanz
Kontrolle	21	nein
therap. D.	5	ja
5fache th.D.	5	ja
10fache th.D.	0	ja

Das statistische Ergebnis besagt, daß den beiden Gruppen (gewaschen — nicht-gewaschen) bezüglich ihrer Phagozytoseleistung unterschiedliche Verteilungen zugrunde liegen. Für die zehnfache therap. Dosis ergibt sich die größte Differenz, die auch noch auf der 1% Stufe (R=3) signifikant ist.

Auf diesen methodischen Effekt wird in der Diskussion noch einmal eingegangen.

b) phagozytierte Enterokokken

In Verbindung mit der Phagozytosehemmung bei sich erhöhender Chloroquindosis nahm die Zahl der Granulozyten, die mehr als fünf Bakterien phagozytiert hatten, prozentual ab, und umgekehrt die Zahl mit weniger als fünf zu. In der folgenden Auswertung wurde nur das erstgenannte Kriterium betrachtet. Die Abnahme zeigte sich durchschnittlich deutlicher bei den nicht-gewaschenen Versuchen.

Tab.3
über fünf
phag. E.,
gewaschene
Versuchsreihe

Vers.- Nr.	Kon- trolle	therap. Dosis	5fache th.D.	10fache th.D.
1	77	63	62	52
2	78	70	53	39
3	53	50	39	21
4	84	65	54	43
5	53	46	61	49
6	67	62	61	40
7	70	44	39	39
8	52	59	49	36
9	59	57	50	34
10	60	30	52	27
$\bar{x}$	65	55	52	38
$\pm s$	11,6	12,0	8,2	9,2

Tab.4
über fünf
phag. E.,
nicht-ge-
waschene
Versuchsreihe

1	64	62	62	45
2	50	64	34	18
3	46	49	21	12
4	75	60	33	45
5	60	66	32	28
6	76	51	43	27
7	54	40	34	20
8	51	56	45	24
9	65	58	28	25
10	38	30	31	27
$\bar{x}$	58	54	36	27
$\pm s$	12,3	11,3	11,3	12,9

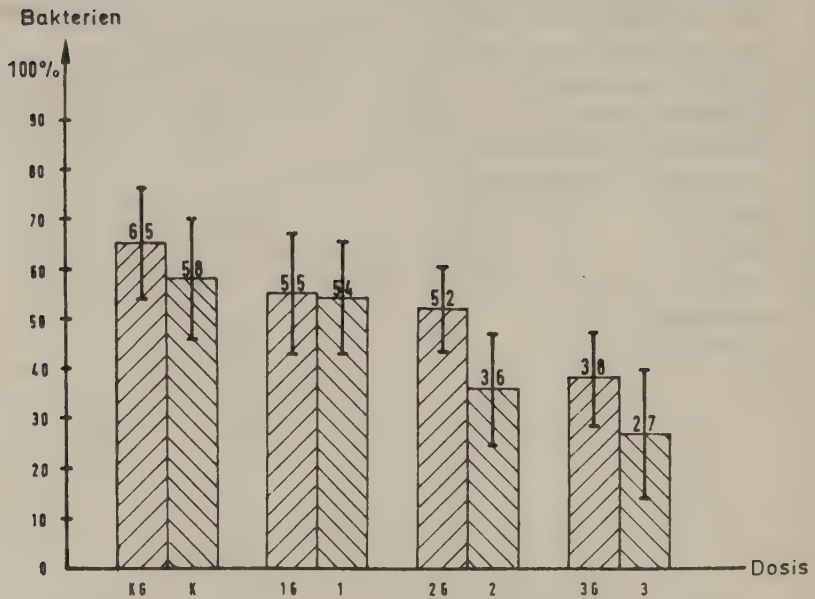


Abb.3 Granulozyten mit mehr als fünf phagozytierten Enterokokken. Prozentwerte der Phagozytose.

Zeichenerklärung wie in Abb.2

FRIEDMAN-Test:

RANGSUMME 1 = 76
 RANGSUMME 2 = 30,5
 RANGSUMME 3 = 20,5
 RANGSUMME 4 = 11

CHI-QUADRAT (FRIEDMAN) = 22,04848485

RANGSUMME 1 = 38
 RANGSUMME 2 = 29
 RANGSUMME 3 = 22,5
 RANGSUMME 4 = 11,5

CHI-QUADRAT (FRIEDMAN) = 22,04848485

23,8 > 10,53 für nicht-gewaschene } Stichproben
 22,2 > 10,53 für gewaschene }

Die Testergebnisse bestätigen, daß sich die phagozytisierte Bakterienzahl, entsprechend der Definition "über fünf", unter den vier verschiedenen Versuchsbedingungen signifikant voneinander unterscheidet.

MULTIPLE VERGLEICHE NACH WILCOXON UND WILCOX

STICHPROBEN RANGDIFFERENZEN

1	- 2	3.5
1	- 3	15.5
1	- 4	25
2	- 3	12
2	- 4	21.5
3	- 4	9.5

KRITISCHE RANGDIFFERENZ SIEHE TAB. 187 IM ANHANG

MULTIPLE VERGLEICHE NACH WILCOXON UND WILCOX

STICHPROBEN RANGDIFFERENZEN

1	- 2	10
1	- 3	15.5
1	- 4	20.5
2	- 3	5.5
2	- 4	16.5
3	- 4	11

KRITISCHE RANGDIFFERENZ SIEHE TAB. 187 IM ANHANG

WILCOXON-WILCOX-Test:

25,0 > 18,0 für nicht-gewaschene } Stichproben
 26,5 > 18,0 für gewaschene }

Die zehnfache therap. Dosis unterscheidet sich mit 1% Irrtumswahrscheinlichkeit von der Kontrolle.

21,5 > 18,0 für nicht-gewaschene Stichproben

Die Differenz zwischen therapeutischer Dosis und zehnfacher therap. Dosis kann nur für nicht-gewaschene Proben bestätigt werden.

c) Zustand der phagozytierten Enterokokken

In Bezug auf die Kontrolle nahm die prozentuale Menge der intakten Bakterien linear mit ansteigender Chloroquinzufuhr zu.

Die Häufigkeit des Merkmales "intakt plus defekt" nahm dagegen fast in gleichem Maße ab. Dieses Ergebnis stand in Zusammenhang mit der Tendenz der neutrophilen Granulozyten, nach Behandlung mit höherer Chloroquindosis weniger Bakterien aufzunehmen (siehe Punkt b).

Die Beurteilung der teilweise bis vollständig von lysosomalen Enzymen angedauten Enterokokken ergab, bezüglich der Kontrolle, eine geringe Reduktion dieser Bakterienform unter therapeutischer Dosierung und, die gewaschenen Proben betreffend, auch noch unter fünffacher therap. Dosierung. Jedoch überstieg die durchschnittliche Zahl defekter Bakterien bei zehnfacher therap. Dosis wieder die des Kontrollwertes, sodaß im Endeffekt keine Tendenz zu erkennen war.

Tab.5
intakte
Enterokokken,
gewaschene
Versuchsreihe

Vers.- Nr.	Kon- trolle	therap. Dosis	5fache th. D.	10fache th. D.
1	22	23	36	35
2	18	28	45	71
3	22	26	37	58
4	3	13	20	28
5	17	17	12	14
6	7	17	19	12
7	14	7	31	25
8	4	6	11	2
9	17	6	20	21
10	9	13	21	45
$\bar{x}$	13	16	25	31
$\pm s$	7,1	8,1	11,4	17,9

Tab.6
intakte
Enterokokken,
nicht-
gewaschene
Versuchsreihe

Vers.- Nr.	Kon- trolle	therap. Dosis	5fache th. D.	10fache th. D.
1	18	19	38	29
2	36	34	62	71
3	17	36	67	50
4	4	8	24	29
5	7	15	24	17
6	5	19	13	19
7	7	24	34	40
8	10	14	18	32
9	15	18	28	50
10	18	31	19	55
$\bar{x}$	14	22	33	39
$\pm s$	9,5	9,2	18,3	17,2

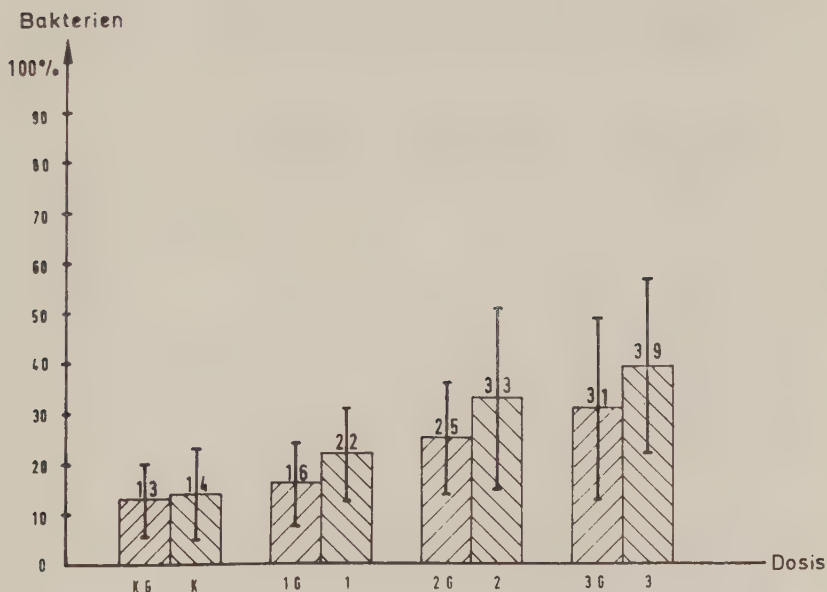


Abb.4 intakte Enterokokken. Prozentwerte der Phagozytose.
Zeichenerklärung wie in Abb.2

FRIEDMAN-Test:

RANGSUMME 1	= 11
RANGSUMME 2	= 21,5
RANGSUMME 3	= 31
RANGSUMME 4	= 36,5

CHI-QUADRAT (FRIEDMAN) = 22,8912611

RANGSUMME 1	= 15,5
RANGSUMME 2	= 21,5
RANGSUMME 3	= 32
RANGSUMME 4	= 31

CHI-QUADRAT (FRIEDMAN) = 11,35363536

22,8 > 10,53	für nicht-gewaschene	} Stichproben
11,3 > 10,53	für gewaschene	

Der zahlenmäßige Unterschied der phagozytierten, intakten Enterokokken ist auf dem 1% Niveau signifikant, und in der nicht-gewaschenen Versuchsreihe am stärksten ausgeprägt.

MULTIPLE VERGLEICHE NACH WILCOXON UND WILCOX

STICHPROBEN	RANGDIFFERENZEN
1 - 2	10,5
1 - 3	20
1 - 4	25,5
2 - 3	9,5
2 - 4	17
3 - 4	5,5

MULTIPLE VERGLEICHE NACH WILCOXON UND WILCOX

STICHPROBEN	RANGDIFFERENZEN
1 - 2	6
1 - 3	16,5
1 - 4	15,5
2 - 3	10,5
2 - 4	9,5
3 - 4	1

WILCOXON-WILCOX-Test:

20,0 > 18,0	} für nicht-gewaschene Stichproben
25,5 > 18,0	

Der Test bestätigt die Differenz zwischen Kontrolle und fünffacher bzw. zehnfacher therapeutischer Dosis ($P=0,01$). Die dazu parallellaufenden gewaschenen Proben sind nur mit $P=0,05$ signifikant.

Tab.7
intakte plus
defekte Ent.,
gewaschene
Versuchsreihe

Vers.- Nr.	Kon- trolle	therap. Dosis	5fache th. D.	10fache th. D.
1	56	48	25	39
2	52	53	30	20
3	33	41	37	16
4	72	60	37	28
5	50	52	57	53
6	61	70	64	44
7	65	56	46	37
8	60	61	47	62
9	48	65	58	34
10	59	48	61	23
$\bar{x}$	56	55	46	36
$\pm s$	10,7	8,8	13,6	14,6

Tab.8
intakte plus
defekte Ent.,
nicht-
gewaschene
Versuchsreihe

1	47	50	44	30
2	36	39	16	9
3	49	36	19	0
4	79	55	37	35
5	54	61	30	28
6	80	58	50	35
7	57	56	36	20
8	58	64	55	34
9	42	53	30	28
10	48	70	31	18
$\bar{x}$	55	50	35	24
$\pm s$	14,5	11,4	12,4	11,8

Bakterien

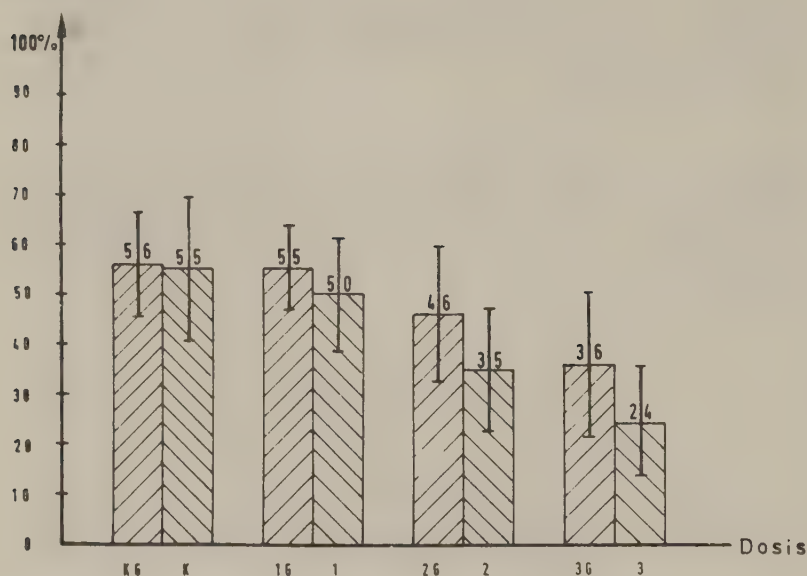


Abb.5 intakte plus defekte Enterokokken. Prozentwerte der Phagozytose. K=Kontrolle, 1=therap.Dosis, 2=fünffache th.Dosis, 3=zehnfache th.Dosis, G=gewaschen, I=Standardabweichung

FRIEDMAN-Test:

RANGSUMME 1 = 15
RANGSUMME 2 = 34
RANGSUMME 3 = 21
RANGSUMME 4 = 16

CHI-QUADRAT (FRIEDMAN) = 8.94

RANGSUMME 1 = 15
RANGSUMME 2 = 32
RANGSUMME 3 = 25
RANGSUMME 4 = 16

CHI-QUADRAT (FRIEDMAN) = 8.94

25,3 > 10,53 für nicht-gewaschene } Stichproben
 8,0 < 10,53 für gewaschene }

Ein signifikanter Unterschied mit 1% Irrtumswahrscheinlichkeit ergibt sich nur für die nicht-gewaschene Versuchsreihe.

MULTIPLE VERGLEICHE NACH WILCOXON UND WILCOX

STICHPROBEN	RANGDIFFERENZEN
1 - 2	1
1 - 3	14
1 - 4	25
2 - 3	13
2 - 4	24
3 - 4	11

MULTIPLE VERGLEICHE NACH WILCOXON UND WILCOX

STICHPROBEN	RANGDIFFERENZEN
1 - 2	5
1 - 3	2
1 - 4	11
2 - 3	7
2 - 4	16
3 - 4	9

WILCOXON-WILCOX-Test:

25,0 > 18,0)
 24,0 > 18,0) für nicht-gewaschene Stichproben

Signifikanz besteht hier zwischen Kontrolle bzw. therapeutischer Dosis und der zehnfachen therapeutischen Dosis. Betreffend des zweiten Vergleiches kann man auf dem 5% Niveau unterschiedliche Verteilungen der gewaschenen Versuchsreihe feststellen (kritische Differenz: 14,8).

Tab.9
defekte
Enterokokken,
gewaschene
Versuchsreihe

Vers.- Nr.	Kon- trolle	therap. Posis	5fache th. D.	10fache th. D.
1	22	29	39	26
2	30	19	25	9
3	45	33	26	26
4	25	27	43	44
5	33	31	31	33
6	32	13	17	44
7	21	37	23	38
8	36	33	42	36
9	35	29	22	45
10	32	39	18	32
$\bar{x}$	31	29	29	33
$\pm s$	7,1	7,9	9,6	11,0

Tab.10
defekte
Enterokokken,
nicht-
gewaschene
Versuchsreihe

1	35	31	18	41
2	28	27	22	20
3	34	28	14	50
4	17	37	39	36
5	39	24	46	55
6	15	23	37	46
7	36	20	30	40
8	32	22	27	34
9	43	29	42	22
10	34	39	50	27
$\bar{x}$	31	28	33	37
$\pm s$	8,9	6,3	12,2	11,6

Bakterien

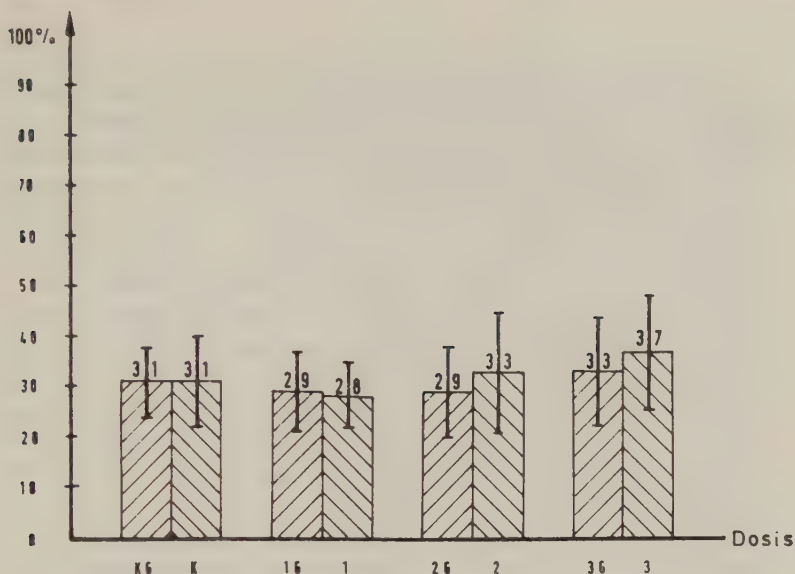


Abb.6 defekte Enterokokken. Prozentwerte der Phagozytose.
Zeichenerklärung wie in Abb.5

Entsprechend der aus der Graphik ersichtlichen, unregelmäßigen Variabilität der Ergebnisse fiel der FRIEDMAN-Test mit Prüfgrößen von 2,5 bzw. 1,6, die deutlich unter dem Schwellenwert 10,53 lagen, negativ aus.

d) Granulierung der phagozytierenden Granulozyten

Das Granulierungsmaß sollte als Parameter einer Lysosomenstabilisierung unter Chloroquineinwirkung betrachtet werden. Im positiven Fall müßte die Granulamenge indirekt wegen der genannten verminderten Phagozytose und direkt infolge einer verringerten Enzymfreisetzung deutlich unter Dosiserhöhung zunehmen.

Die Gesamtgranulierung der phagozytierenden Zellen nahm im Mittel bei therapeutischer Dosierung geringfügig ab, zeigte dann einen geringen Anstieg (nicht-gewaschenes Blut) bzw. keinen Anstieg (gewaschenes Blut) bei der fünffachen therap. Dosis, und lag nach zehnfacher therap. Dosierung unter dem Kontrollwert.

Die Differenzierung nach den drei gewählten Kategorien (siehe 4.1.2.2.b) sollte zeigen, ob sich die Anzahl der Granula, bezogen auf 100% sog. Gesamtgranulierung, unter den verschiedenen Dosen entscheidend verändern würde. Auch hier konnten, wie aus den jeweiligen Graphiken ersichtlich wird, nur unbedeutende Differenzen zwischen den vier Versuchsbedingungen festgestellt werden, die jedenfalls keine Tendenz einer Granulierungsverstärkung in Korrelation mit ansteigender Chloroquindosis erkennen ließen.

Auffallend war, daß die Granulierung in der gewaschenen Versuchsreihe bei weniger Granulozyten vorhanden war, und daß die Granulamenge zu niedrigeren Werten tendierte als in der nicht-gewaschenen Versuchsreihe. Dieses Phänomen trat auch bei den gewaschenen Kontrollen auf.

Tab.11
Gesamtgranulierung,
gewaschene
Versuchsreihe

Vers.- Nr.	Kon- trolle	therap. Dosis	5fache th. D.	10fache th. D.
1	42	56	41	26
2	87	90	98	78
3	80	62	70	61
4	68	84	74	89
5	94	91	98	95
6	72	80	85	85
7	92	75	88	96
8	85	86	88	88
9	77	64	56	76
10	93	78	75	82
$\bar{x}$	79	77	77	78
$\pm s$	15,7	12,2	18,2	20,8

Tab.12
Gesamtgr-
nulierung,
nicht-
gewaschene
Versuchsreihe

Vers.- Nr.	Kon- trolle	therap. Dosis	5fache th. D.	10fache th.D.
1	72	74	79	47
2	83	88	94	60
3	78	67	79	25
4	85	71	75	81
5	98	88	98	93
6	84	88	85	77
7	87	85	95	90
8	89	83	95	84
9	74	69	81	78
10	90	89	81	91
$\bar{x}$	84	80	86	73
$\pm s$	7,8	8,9	8,4	22,1

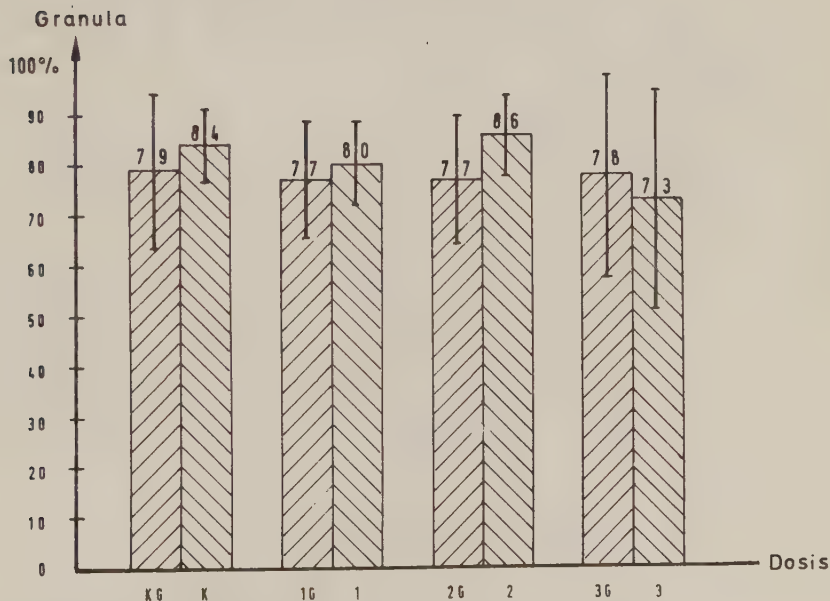


Abb.7 phagozytierende Granulozyten mit Granulierung.
Prozentwerte der Phagozytose.
Zeichenerklärung wie in Abb.5

Tab.13
schwache
Granulierung,
gewaschene
Versuchsreihe

Vers.- Nr.	Kon- trolle	therap. Dosis	5fache th. D.	10fache th. D.
1	68	82	69	85
2	34	31	32	48
3	53	62	63	65
4	56	54	65	41
5	49	44	26	34
6	71	67	82	74
7	45	50	73	30
8	58	44	48	46
9	81	86	93	79
10	52	66	43	72
$\bar{x}$	57	59	59	57
$\pm s$	13,6	17,4	21,6	19,8

Tab.14
schwache
Granulierung,
nicht-
gewaschene
Versuchsreihe

1	53	62	64	60
2	35	31	21	31
3	28	34	39	0
4	49	49	55	52
5	39	29	49	18
6	27	57	67	70
7	56	40	49	52
8	48	42	34	44
9	49	73	74	68
10	33	79	47	80
$\bar{x}$	42	50	50	48
$\pm s$	10,6	17,5	16,0	24,9

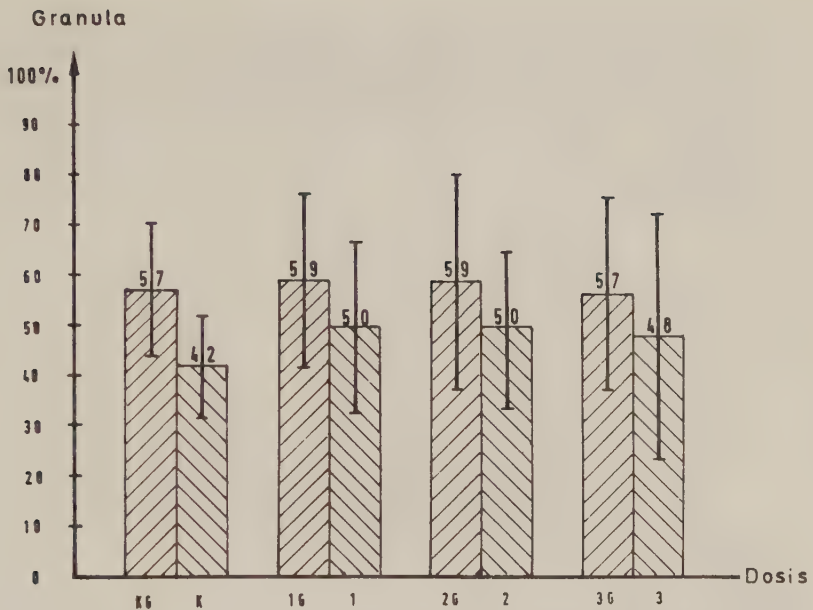


Abb.8 phagozytierende Granulozyten mit schwacher Granulierung. Prozentwerte der Gesamtgranulierung.
Zeichenerklärung wie in Abb.5

Tab.15
mittelmäßige
Granulierung,
gewaschene
Versuchsreihe

Vers.- Nr.	Kon- trolle	therap. Dosis	5fache th. D.	10fache th. D.
1	32	18	31	15
2	54	65	53	48
3	42	36	37	35
4	43	41	33	56
5	48	54	71	63
6	29	33	18	26
7	48	46	27	55
8	37	47	48	49
9	19	14	7	21
10	44	34	52	28
$\bar{x}$	40	39	38	40
$\pm s$	10,4	15,4	18,7	16,7

Tab.16
mittelmäßige
Granulierung,
nicht-
gewaschene
Versuchsreihe

Vers.- Nr.	Kon- trolle	therap. Dosis	5fache th. D.	10fache th. D.
1	47	38	36	40
2	47	62	70	33
3	66	62	55	100
4	42	47	43	40
5	60	66	51	74
6	58	39	33	30
7	41	43	47	37
8	40	47	55	50
9	49	24	26	28
10	46	21	50	20
$\bar{x}$	50	45	47	45
$\pm s$	8,8	15,4	12,7	24,2

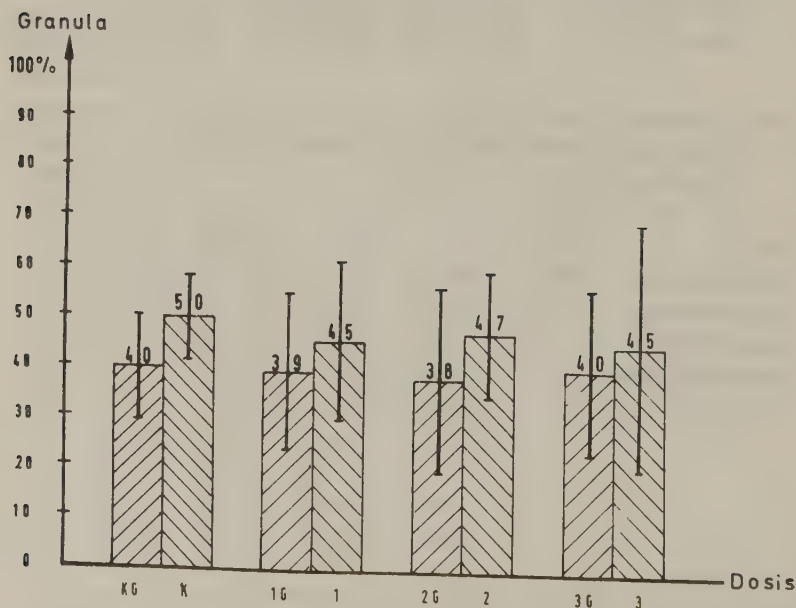


Abb.9 phagozytierende Granulozyten mit mittelmäßiger
Granulierung. Prozentwerte der Gesamtgranulierung.
Zeichenerklärung wie in Abb.5

Tab.17
starke
Granulierung,
gewaschene
Versuchsreihe

Vers.- Nr.	Kon- trolle	therap. Dosis	5fache th. D.	10fache th. D.
1	0	0	0	0
2	12	4	15	4
3	5	2	0	0
4	1	5	2	3
5	3	2	3	3
6	0	0	0	0
7	7	4	0	15
8	5	9	4	5
9	0	0	0	0
10	4	0	5	0
$\bar{x}$	4	3	3	3
$\pm s$	3,8	2,9	4,6	4,6

Tab.18
starke
Granulierung,
nicht-
gewaschene
Versuchsreihe

1	0	0	0	0
2	18	7	9	36
3	6	4	6	0
4	9	4	2	8
5	1	5	0	8
6	15	4	0	0
7	3	17	4	11
8	12	11	11	6
9	2	3	0	4
10	21	0	3	0
$\bar{x}$	9	6	4	7
$\pm s$	8,1	5,1	4,0	10,8

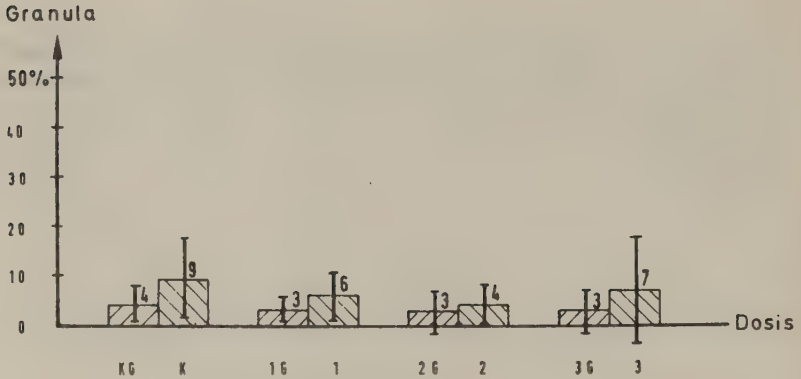


Abb.10 phagozytierende Granulozyten mit starker Granulierung. Prozentwerte der Gesamtgranulierung.
K=Kontrolle, 1=therap. Dosis, 2=fünffache th. Dosis, 3=zehnfache th.Dosis, G=gewaschen, I=Standardabweich.

Die statistische Auswertung der Granulierung ergab keine Aussagen.

e) Granulierung der neutrophilen Granulozyten ohne Phagozytose

Begingt durch die hier angewandte Methodik war an diesen Zellen eine Chloroquinwirkung nicht nachweisbar. Trotzdem wurden sie in die Auswertung miteinbezogen, um einen Vergleich zwischen ihnen und den neutrophilen Granulozyten, die phagozytiert hatten, ziehen zu können.

Die Ergebnisse der Gesamtgranulierung und deren Untergruppierung ließen, wie bei den phagozytierenden Granulozyten, keine bedeutenden Unterschiede unter den vier verschiedenen Versuchsbedingungen erkennen. Auch hierbei zeigten die gewaschenen Blutproben insgesamt eine schwächere Granulierung als die nicht-gewaschenen (siehe Punkt d).

Tab.19
Gesamt-
granulierung,
gewaschene
Versuchsreihe

Vers.- Nr.	Kon- trolle	therap. Dosis	5fache th. D.	10fache th. D.
1	62	63	69	52
2	100	86	98	92
3	76	79	77	79
4	86	76	90	93
5	98	98	99	98
6	83	100	82	84
7	91	92	85	98
8	100	87	81	91
9	81	87	78	85
10	98	98	98	97
$\bar{x}$	88	87	86	87
$\pm s$	12,4	11,5	10,2	13,8

Tab.20
Gesamt-
granulierung,
nicht-
gewaschene
Versuchsreihe

1	85	81	84	57
2	100	100	100	90
3	83	70	92	75
4	100	80	89	96
5	100	97	100	96
6	100	87	96	89
7	94	94	93	96
8	97	97	89	92
9	87	73	79	88
10	93	98	97	98
$\bar{x}$	94	88	92	88
$\pm s$	6,7	11,0	6,8	12,6

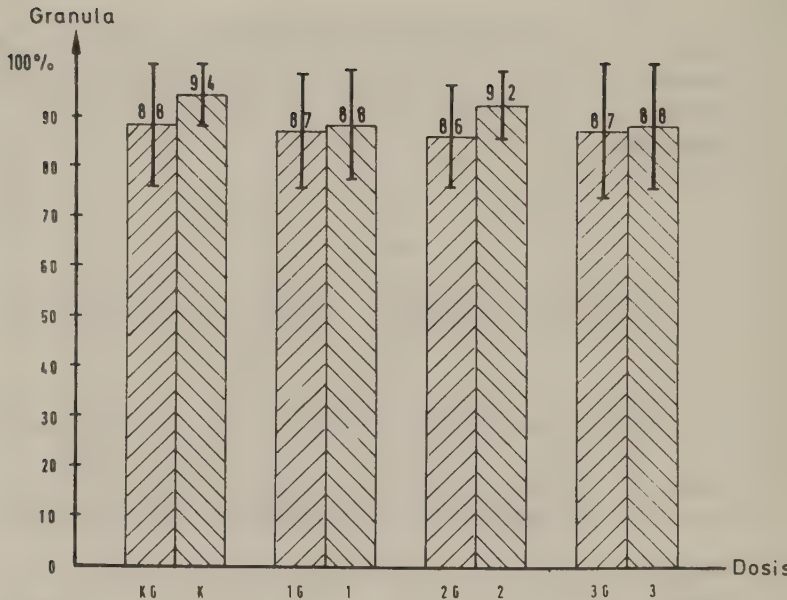


Abb. 11 Granulozyten mit Granulierung. Prozentwerte der nicht-phagozytierenden Zellen.
Zeichenerklärung wie in Abb. 10

Tab. 21
schwache
Granulierung,
gewaschene
Versuchsreihe

Vers.- Nr.	Kon- trolle	therap. Dosis	5fache th. D.	10fache th. D.
1	68	83	48	67
2	15	33	16	40
3	63	32	48	61
4	66	53	48	38
5	33	22	17	29
6	67	63	65	68
7	48	22	86	32
8	43	15	23	30
9	60	85	89	72
10	39	41	47	41
$\bar{x}$	50	45	49	48
$\pm s$	25,4	25,2	25,8	17,1

Tab.22
schwache
Granulierung,
nicht-
gewaschene
Versuchsreihe

Vers.- Nr.	Kon- trolle	therap. Dosis	5fache th. D.	10fache th. D.
1	58	57	42	26
2	28	8	20	22
3	27	24	31	41
4	50	50	67	47
5	16	20	27	21
6	29	54	55	50
7	37	50	54	16
8	14	23	39	27
9	55	52	69	62
10	38	49	38	52
$\bar{x}$	35	39	44	36
$\pm s$	15,3	17,8	16,5	15,8

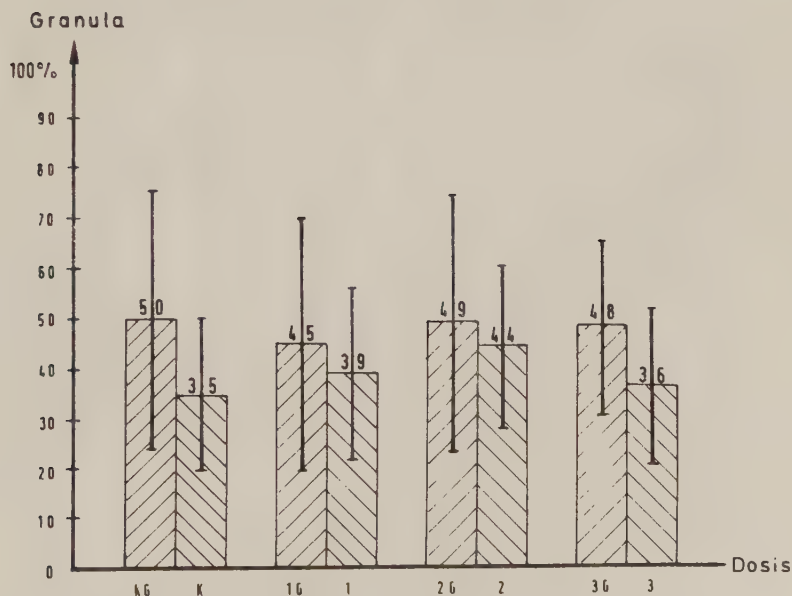


Abb.12 nicht-phagozytierende Granulozyten mit schwacher
Granulierung. Prozentwerte der Gesamtgranulierung.
Zeichenerklärung wie in Abb.10

Tab.23
mittelmäßige
Granulierung,
gewaschene
Versuchsreihe

Vers.- Nr.	Kon- trolle	therap. Dosis	5fache th. D.	10fache th. D.
1	32	17	52	33
2	70	56	48	56
3	32	68	52	39
4	17	42	44	56
5	60	67	75	67
6	33	31	35	32
7	33	56	14	46
8	45	70	69	64
9	40	15	11	26
10	46	56	49	50
$\bar{x}$	41	48	45	47
$\pm s$	11,4	20,5	20,5	14,1

Tab.24
mittelmäßige
Granulierung,
nicht-
gewaschene
Versuchsreihe

1	38	43	52	74
2	54	81	68	45
3	60	67	65	32
4	0	50	33	45
5	75	63	65	63
6	29	46	41	33
7	47	47	41	66
8	57	63	46	54
9	40	48	31	33
10	43	44	50	40
$\bar{x}$	44	55	49	49
$\pm s$	20,3	12,6	13,3	13,9

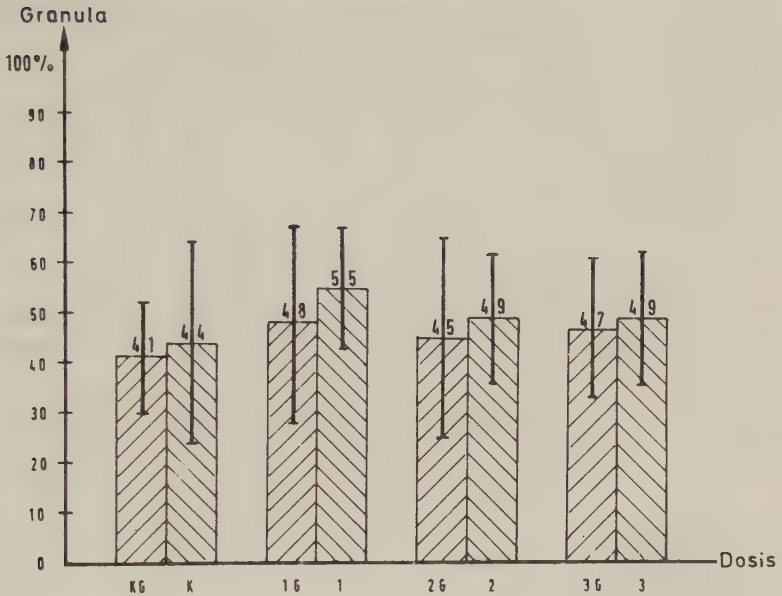


Abb.13 nicht-phagozytierende Granulozyten mit mittelmäßiger Granulierung. Prozentwerte der Gesamtgranulierung. Zeichenerklärung wie in Abb.10

Tab.25
starke
Granulierung,
gewaschene
Versuchsreihe

Vers.- Nr.	Kon- trolle	therap. Dosis	5fache th. D.	10fache th. D.
1	0	0	0	0
2	15	11	36	4
3	5	0	0	0
4	17	5	8	6
5	7	11	8	4
6	0	6	0	0
7	19	22	0	2
8	12	15	8	22
9	0	0	0	6
10	15	3	4	9
$\bar{x}$	9	7	6	5
$\pm s$	7,5	7,1	11,0	6,6

Tab. 26
starke
Granulierung,
nicht-
gewaschene
Versuchsreihe

Vers.- Nr.	Kon- trolle	therap. Dosis	5fache th. D.	10fache th. D.
1	4	0	6	0
2	18	11	12	33
3	13	9	4	27
4	50	0	0	8
5	9	17	8	16
6	42	0	4	17
7	16	3	5	18
8	29	14	15	19
9	5	0	0	5
10	19	7	12	8
$\bar{x}$	21	6	7	15
$\pm s$	15,4	6,4	5,1	10,1

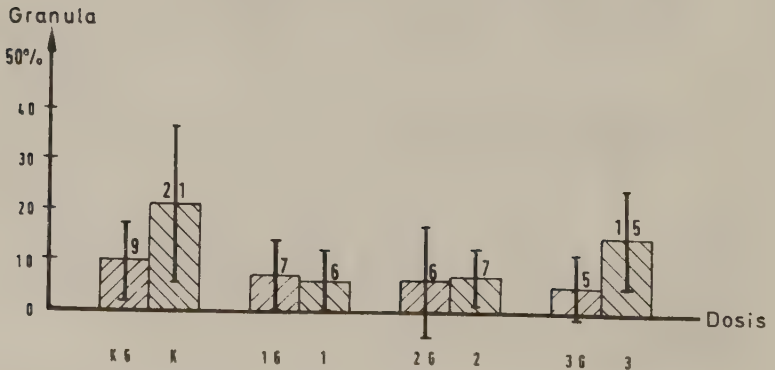


Abb. 14 nicht-phagozytierende Granulozyten mit starker Granulierung. Prozentwerte der Gesamtgranulierung.

Zeichenerklärung wie in Abb. 10

Die statistischen Tests ergaben nur einen signifikanten Unterschied bei der starken Granulierung der nicht-phagozytierenden Zellen, die nicht gewaschen worden waren. Im

FRIEDMAN-Test war daher der Schwellenwert mit 13,9 größer als die tabellierte Prüfgröße mit 10,53.

RANGSUMME 1 = 3,5
RANGSUMME 2 = 15,5
RANGSUMME 3 = 20
RANGSUMME 4 = 11

LEISTUNGSVERGLEICH FRIEDMAN-TEST DER STICHPROBEN

Der WILCOXON-WILCOX-Test bestätigte aber nur den, auch in der Abb.14 erkennbaren Unterschied zwischen Kontrolle und therapeutischer Dosis, dessen Aussagewert unbedeutend ist.

MULTIPLE VERGLEICHE NACH WILCOXON UND WILCOX

STICHPROBEN	RANGDIFFERENZEN
1 - 2	18
1 - 3	13,5
1 - 4	3,5
2 - 3	4,5
2 - 4	15,5
3 - 4	11

f) Vergleich der Granulierung zwischen neutrophilen Granulozyten mit und ohne Phagozytose.

Die Ergebnisse der gewaschenen und der nicht-gewaschenen Versuchsreihen wurden addiert (n=20), und durch einen Mittelwert ausgedrückt.

Die Differenz der Kontrollen bildete in diesem Fall nicht nur einen Vergleichswert gegenüber den verschiedenen Dosen, sondern konnte selbst mit in den Vergleich einbezogen werden.

Gesamtgranulierung: phagozytierende Granulozyten zeigten 7-12% weniger Granulierung unter Chloroquinbehandlung und 9% weniger ohne Medikament.(Abb.15)

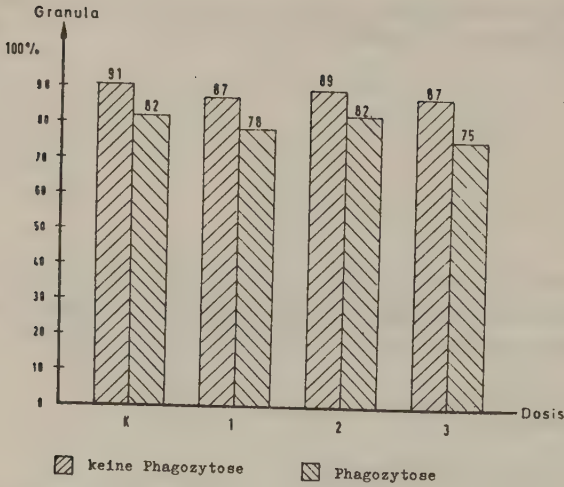


Abb.15 Gesamtgranulierung der neutrophilen Granulozyten. Prozentwerte der Phagozytose.

K=Kontrolle, 1=therapeutische Dosis, 2=fünffache therap.Dosis, 3=zehnfache therap.Dosis

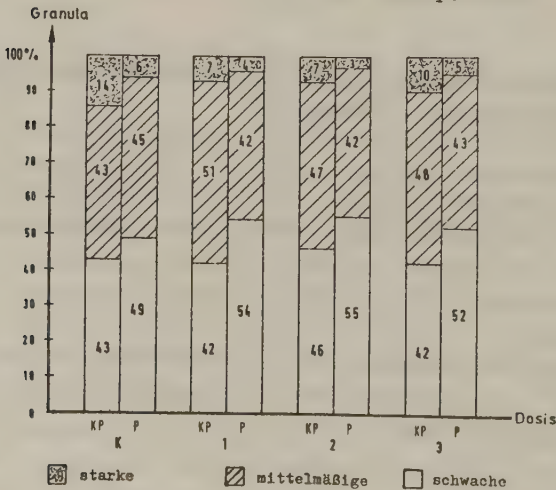


Abb.16

G r a n u l i e r u n g

der neutrophilen Granulozyten. Prozentwerte der Gesamtgranulierung. KP=keine Phagozytose, P=Phagozytose. Weitere Bezeichnung wie in Abb.15

Schwache Granulierung: sie lag bei phagozytierenden Zellen um 9-12% höher, bei der entsprechenden Kontrolle um 6%.

(Abb.16)

Mittelmäßige Granulierung: phagozytierende Granulozyten wiesen 5-9% weniger Granulierung dieser Kategorie auf. Die Kontrollwerte unterschieden sich um 2%. (Abb.16)

Starke Granulierung: diese Form war bei phagozytierenden Zellen um 3-5% geringer ausgeprägt, bei der Kontrolle um 8%. (Abb.16)

Der obengenannte Vergleich ließ allein die Aussage zu, daß die Granulozyten, die phagozytiert hatten, erwartungsgemäß infolge Lysosomenverbrauch eine geringere Granulierung aufzuweisen hatten als diejenigen ohne Phagozytose. Eine Auswirkung des Chloroquin auf die Granulamenge der Zellen konnte auch in diesem Zusammenhang nicht nachgewiesen werden.

g) Ergebnisse der Vollblutversuche

Zur Vervollständigung der Untersuchungen, und um zu prüfen, in wie weit bei den eigenen Versuchen die Plasmaeiweißbindung des Chloroquin eine Rolle bezüglich seiner Wirkung auf die neutrophilen Granulozyten spielen würde, wurden zwei Versuchsreihen mit Vollblut durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tab.27 aufgeführt.

Tab.27 Vollblut- versuchsreihe	Vers.- Nr.	Kon- trolle	therap. Dosis	5fache th. D.	10fache th. D.
Phagozytose- index %	1	56	63	40	25
	2	72	71	50	33
	$\bar{x}$	64	67	45	29
"über fünf" Enterokokken %	1	66	52	38	44
	2	49	55	26	15
	$\bar{x}$	58	54	32	30

Tab.27(Forts.)					
Vollblut- versuchsreihe	Vers.- Nr.	Kon- trolle	therap. Dosis	5fache th. D.	10fache th. D.
intakte	1	11	3	18	20
Enterokokken	2	8	17	26	6
%	$\bar{x}$	10	10	22	13
intakte+defekte	1	66	54	45	52
Enterokokken	2	70	65	40	15
%	$\bar{x}$	68	60	43	34
defekte	1	22	43	37	28
Enterokokken	2	23	18	34	79
%	$\bar{x}$	22	30	35	53
Gesamtgra- nulierung	1	91	86	90	88
	2	89	99	74	76
%	$\bar{x}$	90	93	82	82
Granula	1	45	50	58	36
(+)	2	56	42	54	44
%	$\bar{x}$	50	46	56	40
Granula	1	51	48	42	60
+	2	44	54	46	56
%	$\bar{x}$	48	51	44	58
Granula	1	4	2	0	4
++	2	0	4	0	0
%	$\bar{x}$	2	3	0	2

Auch hier konnte, wie in den Hauptversuchen, eine Phagozytosehemmung, korrelierend mit ansteigender Chloroquindosis, festgestellt werden. In Bezug auf den Kontrollwert fiel die Phagozytoseleistung nach zehnfacher therapeutischer Dosierung um 35% ab, und lag damit zwischen den Ergebnissen der nicht-gewaschenen (49%) und der gewaschenen (30%) Versuche. Dasselbe Verhalten zeigte sich nach fünffacher therapeutischer Dosis (19% gegenüber 15% bzw. 22%). Die Anzahl

und der Zustand der phagozytierten Bakterien verhielten sich folglich ähnlich wie in den Hauptversuchen, und auch im Granulierungsausmaß traten keine Differenzen gegenüber den vorangegangenen Versuchen auf.

Zum besseren Vergleich wurden in der folgenden Abb.17, einem Diagramm mit dem Phagozytoseindex, neben den Werten der Vollblutversuche die Ergebnisse der gewaschenen und nicht-gewaschenen Stichproben (siehe Abb.2) angegeben.

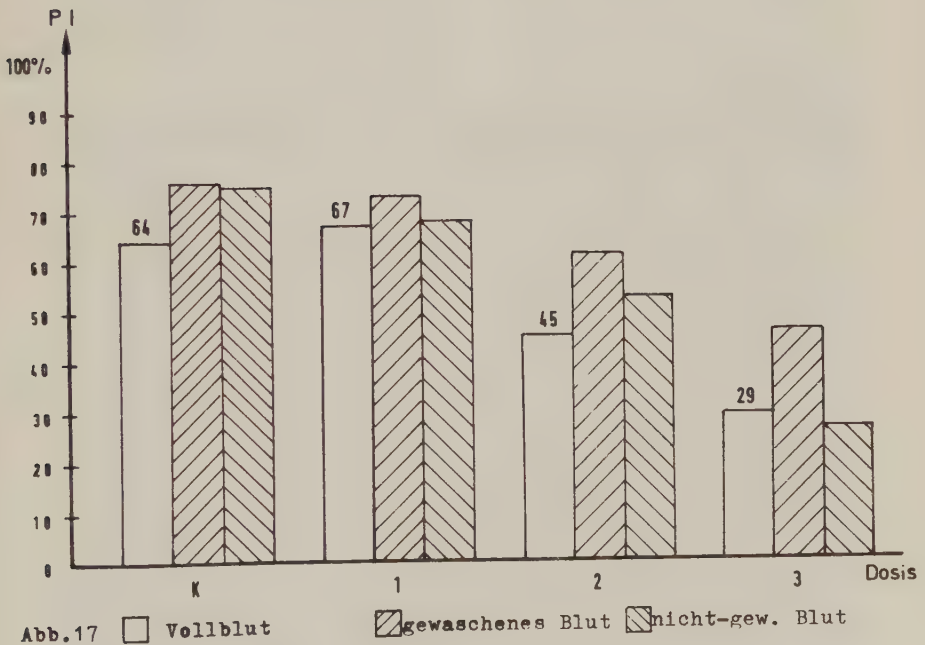


Abb.17 ☐ Vollblut ☒ gewaschenes Blut ☒ nicht-gew. Blut

Phagozytoseindex der neutrophilen Granulozyten.

K=Kontrolle, 1=therap.Dosis, 2=fünffache th.Dosis,

3=zehnfache th.Dosis

h) Ergebnisse der pH-Messung

I. pH-Werte während eines Vollblutversuches.

II. pH-Werte nach Plasmaentzug und nachfolgender Plasmazufuhr mit jeweils 20minütiger Inkubationszeit.

Tab.28 pH-Werte	Kon- trolle	therap. Dosis	5fache th. D.	10fache th. D.
Vollblut	7,415	-	-	-
Vollblut+Chloroquin	-	7,425	7,330	7,250
nach 20' Inkubation	7,550	7,530	7,480	7,400
nach Bakterienzuf.	7,530	7,530	7,470	7,410
nach 45' Inkubation	7,590	7,580	7,530	7,460
Mittelwert $\bar{x}$	7,521	7,516	7,453	7,380
plasmafreies Blut	7,400	-	-	-
plasmafrei+Chloroq.	-	7,415	7,315	7,220
nach Plasmazufuhr	7,525	7,490	7,440	7,350
Mittelwert $\bar{x}$	7,463	7,453	7,378	7,285

pH-Normalwerte im arteriellen Vollblut: 7,386-7,462 (19)
Abweichung vom Mittelwert: 0,038 pH-Einheiten.

Die Messungen zeigten, daß das Blut dosisabhängig acid wurde, sich während der Inkubationszeiten langsam wieder dem Normalbereich näherte, und teilweise, während der Phagozytosephase, sogar alkalisch wurde. Die Differenz zwischen Kontrolle und zehnfacher therap. Dosis betrug durchschnittlich 0,141 pH-Einheiten. Aus dem zweiten Teil der Tabelle wird die puffernde Wirkung des Plasmas ersichtlich, die aber nicht ausreichte, um die dosisabhängige Acidität in der Blutzellenfraktion wieder zu beseitigen, sodaß sich der pH-Wert bei hoher Dosis um 0,178 pH-Einheiten vom Kontrollwert unterschied. Diese zunehmende Acidose des Blutes nach Dosiserhöhung ging über den physiologischen Toleranzbereich um das 4-5fache hinaus, jedoch lag sie noch innerhalb der Grenze, deren Überschreitung einen Einfluß auf die Chloroquinadsorption und -zellaufnahme hätte (12), worauf schon hingewiesen wurde (Punkt 4.1.).

i) Ergebnisse der Osmolalitätsmessung

Gleichzeitig mit der pH-Messung im Vollblut wurde nach der 20minütigen Inkubationszeit die Osmolalität des Plasmas bestimmt.

Tab.30	Kontrolle	therap.D.	5fache th.D.	10fache th.D.
mOsm/kg H ₂ O	295	295	290	295

Normalwerte: 281-300 mOsm/kg H₂O (19)

Eine Veränderung der osmotischen Aktivität nach Chloroquinapplikation konnte nicht nachgewiesen werden.

4.2.3. Zusatz: beobachtete Veränderungen im Blutbild nach Behandlung mit der zehnfachen therapeutischen Chloroquindosis.

Während der Durchführung der eigenen Versuche konnte man feststellen, daß sich das Blut, das mit der zehnfachen th. Chloroquindosis behandelt und vorher nicht gewaschen wurde, in irgendeiner Weise nach Beendigung der Phagozytosephase verändert hatte. Makroskopisch war, wenn man das Blut an der Glasröhrchenwand ablaufen ließ, eine Schlierenbildung beobachtbar. Im Mikroskop fiel eine Zusammenlagerung der Thrombozyten auf, die vergleichbar wäre mit der Agglomeration (sog. "leucocytic sticking") der neutrophilen Granulozyten während des Phagozytosevorganges (7). Weiterhin war die Fluoreszenz der Thrombozyten abgeschwächt, und ihr Durchmesser zugunsten einer Strukturauflockerung vergrößert, die eine Aufquellung der Zellen vermuten ließ. Zwischen den Aggregationen wurden fluoreszierende, fadenbildende Niederschläge gefunden.

Die Frage stellte sich, ob diese Veränderungen durch das Chloroquin oder durch das, als Antikoagulans benutzte Heparin verursacht worden waren. Experimente von GREILING (20) weisen darauf hin, daß bestimmte Sulfomucopolysaccharide, darunter α -Heparin, mit Chloroquin in Komplexe über-

geführt und turbidimetrisch erfaßt werden können. Diese Komplex- bzw. Fällungsreaktion konnte selbst in einem qualitativen Ansatz nachvollzogen werden.

Die Vermutung lag nahe, daß die beobachtete Fadenbildung auf die genannte Komplexbildungsreaktion zurückzuführen sein könnte. Da bei den gewaschenen Versuchsreihen mit zehnfacher therap. Dosis dieser Effekt nicht auftrat, wurde angenommen, daß die zur Waschung verwendete relativ große Menge HANK-Lösung die Komplexe wieder ganz oder teilweise löste, wie es in ähnlicher Weise mit Natriumchlorid möglich ist (20). Prinzipiell vergleichbare chemische Reaktionen wurden von BERGMAYER (8) dargestellt.

Unklar blieb, warum sich die Thrombozyten zusammengelagert hatten. Mit Hilfe des Plättchenaggregationstestes und des Thrombelastogrammes wurden weitere Untersuchungen angeschlossen, deren Ergebnisse an anderer Stelle aufgeführt werden, da sie nicht mehr zum Thema der vorliegenden Arbeit gehören.

5. Prospektive Betrachtung der Wirkungen anderer Antirheumatika mit Hilfe der bei Chloroquin (Resochin^R) angewandten Methodik im Einmalversuch.

5.1. Material und Methode

Die vier Medikamente Solu-Decortin^R, Aspisol^R, Butazolidin^R und Adriablastin^R wurden in ihrer zehnfachen therapeutischen Dosis auf die Eigenschaft einer Phagozytosehemmung hin untersucht und in Bezug zu einer pharmakonfreien Kontrolle gesetzt.

Charakterisierung der Medikamente:

Die drei erstgenannten Pharmaka gehören zur Gruppe der sog. symptomatisch wirksamen Antirheumatika, und zeichnen sich durch ihre gemeinsame antiphlogistische Eigenschaft aus (41). Adriablastin^R wirkt zytostatisch auf die DNA-Replikation und RNA-Transkription (66).

Die Methode entsprach dem in 4.1.2. beschriebenen Verlauf mit nicht-gewaschenen heparinisierten Blutproben, wobei aus Dosierungsgründen 2,5ml Vollblut als Ausgangswert diente.

Tab.31 Dosis und Kurzbezeichnung der vier Antirheumatika.

Pharmakon in Lösung	10fache therap.Dosis in ml/2,5ml Vollblut	Bezeichnung in Abb.18-20
Solu-Decortin ^R	0,060	SD
Aspisol ^R	0,150	AS
Butazolidin ^R	0,015	BU
Adriablastin ^R	0,150	AD

pH-Messung:

I. In der Vorschrift für die Adriablastinanwendung wird auf eine acide Reaktion der Medikamentenlösung hingewiesen. Die eigene pH-Messung im Vollblut nach Adriablastinzufuhr ergab pH=7,5, also keine Acidität.

II. Dagegen war der pH-Wert nach Aspisdosierung mit pH=5,7 stark ins Saure verschoben.

5.2. Ergebnisse

Die Phagozytose wurde durch Aspisol^R um 30% gehemmt. Ursache könnte die saure Eigenschaft des Medikamentes gewesen sein. Mit Adriablastin^R betrug die Hemmung 9%. Nach Solu-Decortin^R- und Butazolidin^R-Behandlung konnte kein Unterschied zur Kontrolle festgestellt werden. (Abb.18)

Die Menge der über fünf phagozytierten Bakterien verringerte sich nur mit Aspisol^R und Adriablastin^R um 5% gegenüber der Kontrolle. (Abb.19)

Die größten Differenzen, den Bakterienzustand betreffend, zeigten sich mit Aspisol^R- (6% mehr intakte Enterokokken) und mit Butazolidin^R- Applikation (30% mehr intakte+defekte Enterokokken, 32% weniger defekte E.) gegenüber dem Kontrollergebnis. (Abb.20)

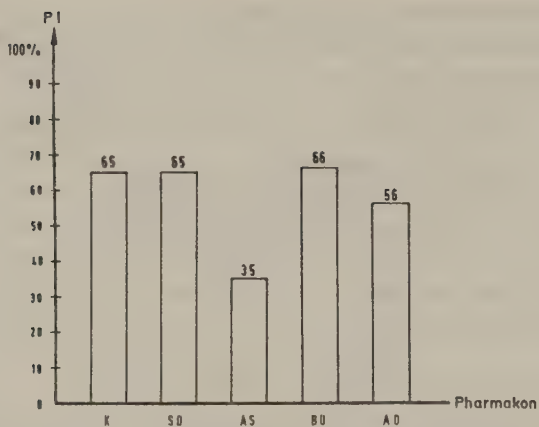


Abb.18 Phagozytose neutrophiler Granulozyten/100 ausgezählte Granulozyten = Phagozytoseindex
K=Kontrolle, weitere Bezeichnung laut Tab.31

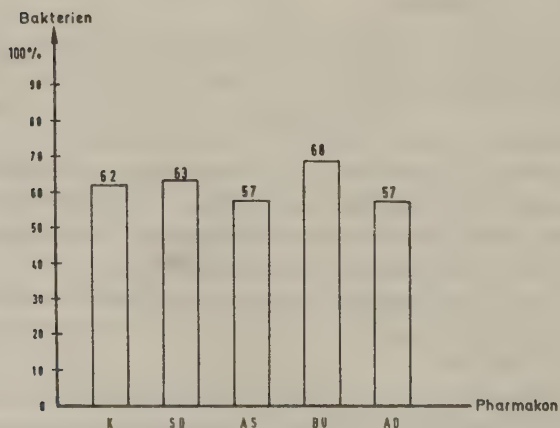


Abb.19 Granulozyten mit mehr als fünf phagozytierten Enterokokken. Prozentwerte der Phagozytose.
Zeichenerklärung wie in Abb.18

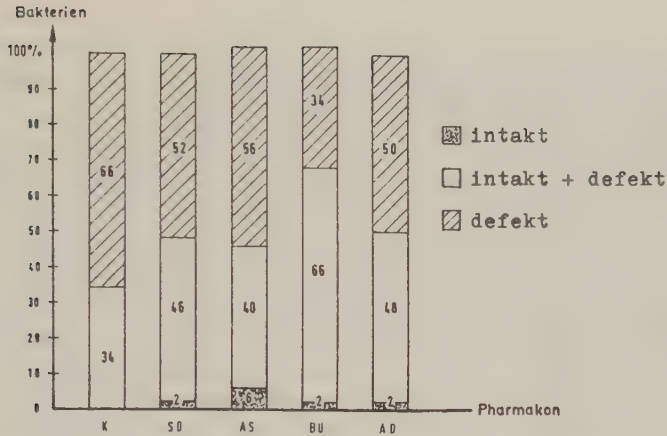


Abb.20 Zustand der phagozytierten Enterokokken. Prozentwerte der Phagozytose. Zeichenerklärung wie in Abb.18

Die relative Phagozytosehemmung von 49% durch die zehnfache therapeutische Chloroquindosis (siehe Abb.2) konnte von den hier untersuchten Pharmaka nicht erreicht werden. Folglich verschoben sich auch nicht die anderen, von der Phagozytose abhängigen Parameter im gleichen Maße wie unter Chloroquin-einwirkung (Abb.3-6).

Die Methodik schien für die Prüfung der Aspisol^R- Wirkung wegen seines sauren Charakters ungeeignet, da sie zu falsch positiven Ergebnissen führen könnte.

Untersuchungen mit Cortisonpräparaten , wie zB. Solu-Decortin^R, deren Bedeutung neben den anderen genannten Eigenschaften in ihrer immunsuppressiven Wirkung liegen soll (41), werden in einer anderen Arbeit durchgeführt werden.

6. Diskussion

Die Fragestellung, ob die neutrophilen Granulozyten nach Behandlung mit Chloroquin (Resochin^R) in ihrer Phagozytoseleistung beeinflusst werden können, konnte durch die eigenen Versuche im positiven Sinn beantwortet werden. Die Hemmung der Phagozytose stand in Korrelation mit der Chloroquindosis, und konnte im FRIEDMAN-Test statistisch als signifikant angesehen werden ($P=0,01$). Die Stichproben ($n=10$) mit therapeutischer Dosis unterschieden sich von den Kontrollwerten um 3% bzw. 7% (gewaschenes — nicht-gewaschenes Blut), diejenigen mit fünffacher therapeutischer Dosis um 15% bzw. 22% und jene mit zehnfachen therapeutischer Chloroquindosis um 30% bzw. 49%. Ein multipler Vergleich der einzelnen Dosen untereinander (WILCOXON-WILCOX-Test) ergab einen signifikanten Unterschied ($P=0,01$) zwischen Kontrolle bzw. therapeutischer Dosis und der zehnfachen therapeutischen Dosis.

Bei 2.2.2. wurde schon auf die Untersuchungen anderer Autoren bezüglich einer Phagozytosehemmung durch Chloroquin hingewiesen. Dazu muß bemerkt werden, daß bei einigen Arbeiten die verabreichte Dosis mit 10^{-5} bis $10^{-3}M$ (5,10,57, 58) um Zehnerpotenzen höher lag als die bei den eigenen Versuchen verwendete (10^{-7} — $10^{-6}M$ Chloroquindiphosphat/1,75ml Blut). Allerdings wurde dort nicht die Menge des Granulozytenmaterials genannt, an dem die Chloroquindosis geprüft wurde, und ebenso nicht das zahlenmäßige Ausmaß der Phagozytosehemmung, sodaß kein exakter Vergleich der eigenen Meßwerte mit früheren Ergebnissen gezogen werden konnte. Die Studie von SYURIN (60) soll besondere Erwähnung finden. Sie ist eine der wenigen, in der Literatur gefundenen, die sich mit Rheumapatienten befaßte, bei denen nach Chloroquinbehandlung die Phagozytoseaktivität mit β -hämolysierenden Streptokokken geprüft wurde, zu deren Gattung auch die in dieser Arbeit verwendeten Enterokokken gehören. SYURIN konnte eine reduzierte Phagozytose der neutrophilen Granulozyten

feststellen, die innerhalb von sechs Monaten Therapie deutlich zu beurteilen war. Das läßt die Folgerung zu, daß die nach täglicher Zufuhr auftretende Akkumulation des Chloroquin im Gewebe und in den Blutzellen einen entscheidenden Faktor der medikamentösen Wirkung darstellt. Dem würde auch die klinische Überlegung entsprechen, daß der Einsatz von Chloroquin vorwiegend bei Früherkrankungen der chronischen Polyarthrititis mit geringer Aktivität, infolge der drei- bis sechsmonatigen Wartezeit bis zum Wirkungseintritt, indiziert ist (36). Die bei den eigenen in vitro Versuchen benutzte zehnfache therapeutische Dosis könnte, bezüglich ihrer phagozytosehemmenden Stärke, mit jener längerdauernden in vivo Dosierung am besten vergleichbar sein. Voraussetzung wäre, daß die Phagozytosehemmung überhaupt ein Kriterium für den Therapieerfolg darstellt. Daneben wäre zu bedenken, daß die eigenen Versuche mit dem Blut gesunder Probanden durchgeführt wurden, und die Ergebnisse deshalb nicht unbedingt das Verhalten der neutrophilen Granulozyten von Rheumapatienten widerspiegeln müssen.

Die Frage stellte sich noch, warum die therapeutische Chloroquinosis nur eine geringe Phagozytosehemmung auszulösen vermochte. Wenn man von der oben genannten Möglichkeit absieht, daß nur eine Akkumulation bzw. eine hohe einmalige Chloroquinosis zur deutlichen Hemmung führen kann, so könnte man in Erwägung ziehen, daß vielleicht eine Adsorption von freiem Chloroquin an die Zellwand der Enterokokken stattgefunden hatte. Bekanntlich besteht die Wand gram-positiver Bakterien bis zu 50% aus Murein (Polysaccharid-Peptid-Komplex) (9), und besitzt daher auch Anionen, mit denen Chloroquin als Base reagiert haben könnte. Auch eine Anlagerung von Chinolinaggregaten wäre denkbar gewesen. Dadurch könnte die Phagozytosefähigkeit der neutrophilen Granulozyten behindert worden sein.

Andererseits könnte Chloroquin durch das Heparin (Liquemin^R), mit dem das untersuchte Blut antikoaguliert wurde, teilweise

infolge eines Heparinüberschusses inaktiviert und damit der Phagozytosehemmung entzogen worden sein, da, wie GREILING (20) herausfand, Chloroquin mit α -Heparin einen Komplex eingehen kann. Seine Methode gilt jedoch nur für isolierte Mucopolysaccharidfraktionen (20). Wie sich diese chemische Reaktion im Blutmilieu verhält, kann hier nicht beurteilt werden. Man kann aber annehmen, daß die Niederschläge, die sich in den Ausstrichen mit zehnfacher therapeutischer Dosis im nicht-gewaschenen Blut finden ließen, auf einer solchen Komplexbildung beruhten.

Eine andere Beeinflussung der Phagozytose stellte sich aufgrund der angewandten Methodik heraus. Diejenigen Granulozyten der Blutproben, die mit HANK-Lösung gewaschen worden waren, wiesen eine durchweg schwächere Hemmung der Phagozytose auf als die entsprechenden nicht-gewaschenen. Die Differenz war mit 20% am deutlichsten bei der zehnfachen therapeutischen Dosis zu erkennen. Statistisch konnte zwischen jeder der drei Dosen ein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($P=0,05$), während die Kontrollen gut übereinstimmten. DONATO (12) hatte eine Reduktion der Chloroquinadsorption und -aufnahme in die Zelle bis zu 15% gemessen, die durch eine Waschung mit HANK-Lösung nach der Chloroquinzufuhr verursacht wurde. Bei den eigenen Versuchen lief der Arbeitsvorgang zwar in umgekehrter Reihenfolge ab, aber man kann annehmen, daß auch Chloroquin die Waschlösung wieder verdrängen konnte. Da nach der Waschung nicht die gesamte Lösung aus dem Blut entfernt werden konnte, wäre ihre Anlagerung an die Zelloberfläche der Granulozyten denkbar gewesen, wodurch weniger Platz für die Chloroquinadsorption zur Verfügung gestanden hätte.

Im Zusammenhang mit einer solchen Wechselwirkung steht vielleicht auch die Beobachtung, daß bei, mit zehnfacher Dosis behandelten, gewaschenen Blutproben nicht die oben genannten Niederschläge auftraten, da freies Heparin vorher mit HANK-Lösung ausgewaschen worden war.

Einen weiteren, mit dem Chloroquin konkurrierenden Faktor stellt die Farbstofflösung Pseudoisocyaninchlorid dar. Wie schon beschrieben wurde (4.1.1.), wird sie in Aggregatform an die Zelloberfläche angelagert. Die Phagozytose selbst konnte, da sie der Färbung vorangegangen war, nicht beeinflusst werden, aber die Fluoreszenzkraft der Granulozyten hätte abgeschwächt werden können. Mikroskopisch zeigte sich jedoch keine Fluoreszenzverminderung.

Die Bedeutung einer medikamentösen Phagozytosehemmung, die in diesem ersten Abschnitt der Arbeit angesprochen wurde, kann mit der Betrachtung der pathologischen Faktoren, die zB. für die rheumatoide Arthritis oder den Lupus erythematoses relevant sind, noch verdeutlicht werden. Bei beiden Erkrankungen spielen Immunkomplexe, die von Synovialzellen oder Granulozyten der Gelenkflüssigkeit, bzw. von Granulozyten unter Bildung sog. LE-Zellen phagozytiert werden, eine zumindest symptomatische Rolle (2,13,47). Eine folglich anzustrebende Verminderung der Immunkomplexbildung, meßbar zB. am Verschwinden des Rheumafaktors aus dem Serum, konnte in unterschiedlichem Ausmaß bei Chloroquin-behandelten Rheumapatienten festgestellt werden (30).

Zur Darstellung der verminderten Phagozytoseleistung nach Chloroquinbehandlung dienten Enterokokken. Die Zahl der zu phagozytierenden Bakterien pro Granulozyt wurde auf ein Verhältnis von 5:1 ausgerechnet, um in Anbetracht der 45minütigen Inkubationszeit ein gutes Phagozytosemittelmaß zu erreichen (63). Daraus ergab sich die anschließende Beurteilung nach den zwei Kategorien mit mehr oder weniger als fünf phagozytierten Enterokokken. Die Anzahl von fünf und mehr aufgenommenen Bakterien nahm entsprechend der gesamten Phagozytosehemmung um durchschnittlich 27% bzw. 31% (gewaschenes — nicht-gewaschenes Blut) ab ($P=0,01$ im FRIEDMAN-Test). Das methodische Problem bestand darin, die exakte Zahl in der Nährbouillon zu ermitteln, da im Phasenkontrastmikroskop die Zählung durch die typische Streptokokkenformation

häufig erschwert war, und die Umrechnung auf die Bakterien-gesamtmenge einen unvermeidlichen systematischen Rechenfehler enthalten mußte. Da ebenso die Granulozytenbestimmung mittels Zählkammer nicht genau die Zellzahl im Probenblut widerspiegelte, konnte folglich das angestrebte Verhältnis von Bakterien zu Granulozyt nicht immer erreicht werden. Trotz dieser daraus resultierenden Schwankungsbreite zwischen den einzelnen Versuchen konnte doch die dosisabhängige, reduzierte Bakterienaufnahme eindeutig festgestellt werden. Unter diesen Voraussetzungen eine Einzelzählung der Kokken durchzuführen, wie sie TYMPNER (63) vornahm, schien unangemessen zu sein.

Der Zustand der Enterokokken war sehr gut beurteilbar, da gegenüber den intakten Bakterien die Größe der enzymatisch angegriffenen im Sinn einer Strukturauflockerung zunahm, und dadurch eine abgeschwächte Fluoreszenz wegen mangelhafter Aggregationsfähigkeit des Farbstoffes an der Bakterienoberfläche die Folge war. Die Differenzierung des Enterokokkenzustandes ergab, daß die Granulozytenzahl mit intakten Bakterien korrelierend mit ansteigender Dosis um 18% bzw. 25% (gewaschenes — nicht-gewaschenes Blut) signifikant anstieg ($P=0,01$). Die Zellzahl mit defekten Bakterien blieb mit 2% bzw. 6% fast unverändert, und diejenige mit beiden Merkmalen fiel um 20% bzw. 31% signifikant ab ($P=0,01$ im FRIEDMAN-Test). Das zuletzt genannte Ergebnis stand in besonderer Beziehung zur dosisabhängigen Phagozytosehemmung, weil bei zehnfacher therapeutischer Dosis allgemein weniger Bakterien phagozytiert wurden, und daher auch seltener "intakte plus defekte" Enterokokken angetroffen werden konnten. Bemerkenswert war, daß die Granulozyten dosisabhängig eine verminderte lysosomale Aktivität aufwiesen, die sich indirekt durch die ansteigende Zahl intakter Bakterien ausdrückte. Die Ursache dafür könnte in einer Stabilisierung der Granula durch Chloroquin liegen.

Eine genauere Aussage über eine Lysosomenstabilisierung

sollte durch die mikroskopische Prüfung der Granulamenge im Granulozytenplasma gemacht werden. Die Tatsache, daß überhaupt eine intrazelluläre Chloroquinaufnahme stattfindet, wurde von DONATO (12) bestätigt, der 6-10 μM radioaktives Chloroquin zwei Stunden lang auf Fibroblasten hatte einwirken lassen. Die Dosen entsprachen ungefähr den bei den eigenen Versuchen verwendeten, die Einwirkungszeit war aber gegenüber zwanzig Minuten wesentlich länger. Die Frage stellte sich, ob eine so lange Behandlungszeit auch bei Granulozyten erforderlich gewesen wäre, um ihnen die Chloroquinaufnahme und -anlagerung an die Granula zu gestatten, und ob die Granulozyten wegen ihrer beschränkten Überlebenszeit dann noch beurteilbar gewesen wären. Es wäre schon denkbar, daß erst eine zweite, langsame und ca. drei Stunden dauernde Chloroquinaufnahme diese intrazellulären Reaktionen bewirken könnte (43).

Einen wichtigen Faktor für die Chloroquinverteilung an und in der Zelle soll auch der pH-Wert darstellen. So konnte in einer früheren Arbeit die intrazelluläre Aufnahme bei nur geringer Dosierung (2 μM) nach einer pH-Erhöhung von 7,4 auf 8,1 um das doppelte gesteigert werden (12). Anderweitig wurde herausgefunden, daß die Chloroquinakkumulation (Dosis in mM) in isolierten Lysosomen von einem Anstieg des intralysosomalen pH-Wertes begleitet war, der normalerweise bei $\text{pH} \approx 3-6$ liegen soll (45). Bekanntlich nimmt zB. bei rheumatoider Arthritis unter anderem die Acidität in der Synovialflüssigkeit infolge einer Laktat- und CO_2 -Erhöhung zu, wodurch die Freisetzung von Enzymen aus untergehenden Synovialzellen erleichtert wird (47). Eine durch Chloroquin bedingte pH-Verschiebung ins Alkalische würde dann bedeuten, daß saure Enzyme, wie zB. β -Glucuronidase (9,57,58) wenigstens nicht mehr freigesetzt werden könnten, was einer sog. Lysosomenstabilisierung gleichkommen würde.

Die eigenen pH-Messungen zeigten mit Erhöhung der Chloroquinosis zunehmend acidere Blutwerte an, die jedoch, mit

durchschnittlich 0,16 pH-Einheiten weniger als die Kontrollen, wahrscheinlich keine bedeutende Minderung der Adsorption von Chloroquin verursacht haben können. Es ist anzunehmen, daß auch in der Wechselwirkung von Granulozytenbestandteilen und Chloroquindiphosphatmolekülen diejenigen chemischen Reaktionen stattgefunden haben (Protonenverschiebungen), die von anderen Autoren beschrieben wurden (12,26), und auf die schon hingewiesen wurde (2.2.2.).

Im Fluoreszenzmikroskop ließen sich, bezüglich einer veränderten Granulozytengranulierung nach Chloroquineinwirkung, im Ganzen gesehen keine eindeutigen Beobachtungen machen, die auf eine lysosomale Stabilisierung hindeutenden. Die durchschnittliche Gesamtgranulierung der behandelten, phagozytierenden Granulozyten lag bei 79%, die der Kontrollen um 3% höher. Eine richtungsweisende Ab- oder Zunahme konnte nicht festgestellt werden. Nebenbei wäre zu bemerken, daß das Granulierungsausmaß individuelle, Probanden abhängige Unterschiede aufwies, die die objektive Beurteilung nach einer mehr oder weniger starken Granulierung zusätzlich zu der mikroskopischen Kleinheit der Granula erschwerte. Die gute Fluoreszenz der Granula, besonders der zu 25% vorkommenden azurophilen (39), rechtfertigte trotzdem die differenzierende Auswertung. Die schwache Granulierung der behandelten Granulozyten unterschied sich um 6-8% (nicht-gewaschenes Blut) und um 0-2% (gewaschenes Blut) von den Kontrollergebnissen. Mit gleichem Bezug ergaben sich bei mittelmäßiger Granulierung der Zellen Differenzen von 3-5% bzw. 0-2%, und bei starker Granulierung 2-5% bzw. 1%. Eine dosisabhängige Tendenz war auch hier nicht ersichtlich. Auffällig war jedoch, daß die Granulationsstärke der gewaschenen Stichproben in allen Dosisbereichen, einschließlich der Kontrollen, geringere Werte erreichte als die der nicht-gewaschenen. Ob das mit der Waschung der Proben und der damit verbundenen längeren Behandlungsdauer der Granulozyten zusammenhing, ist fraglich.

Die entsprechenden Ergebnisse der nicht-phagozytierenden Granulozyten standen in Analogie zu denen der phagozytierenden. Ein Vergleich der beiden Gruppen ließ erkennen, daß nicht-phagozytierende Zellen, wie zu erwarten, prozentual häufiger Granulierung aufwiesen, und mengenmäßig mehr zu sog. starker Granulierung tendierten. Wegen der trotzdem nur geringen Differenzen könnte man annehmen, daß entweder nur relativ wenige Granula zur Abtötung der phagozytierten Enterokokken aktiviert wurden, oder daß ein Unterschied der Granulation eventuell durch Überlagerung von Granula mikroskopisch nicht mehr genau erfaßt werden konnte.

Auch wenn die eigenen Versuche keine Hinweise auf eine Lysosomenstabilisierung brachten, so wird sie doch vielfach als tatsächliche oder vermutete Eigenschaft des Chloroquin postuliert. Spezielle methodisch-technische Faktoren, die bei den eigenen Versuchen nicht besonders berücksichtigt wurden, scheinen überhaupt eine wesentliche Rolle zu spielen, um die Degranulation optimal demonstrieren zu können (24). Klinisch gesehen wäre zB. bei der Therapie der rheumatoiden Arthritis eine Stabilisierung der Lysosomen sicher wünschenswert, da dadurch der fortlaufenden Freisetzung lysosomaler Enzyme entgegengewirkt und damit der "circulus vitiosus" unterbrochen werden könnte (47).

Als Nebentbefund während der Auszählung wurde beobachtet, daß neutrophile Granulozyten ohne Granula zum Teil Vakuolen enthielten. Eine bereits abgelaufene Phagozytose mit völliger Auflösung der Bakterien und Freisetzung von Granula konnte nicht stattgefunden haben, weil die Struktur der Zellen erhalten geblieben war. Bei einer Autolyse der Granulozyten hätte man an eine Streptolysinwirkung (Strep. S) der Enterokokken denken müssen (7,67). Eine Bildung sog. "autophagic vacuoles" nach Chloroquinapplikation wurde beobachtet (1,26). Die zwei zusätzlichen Versuche mit Vollblut, bei denen die Durchführung und Auswertung bis auf die Plasmaentfernung wie bei den Hauptversuchen verlief, zeigten betreffend der Pha-

gozytosehemmung und der gleichförmigen Granulierung analoge Ergebnisse.

Als Nebenbefund wurden bei den nicht-gewaschenen Blutproben, die mit zehnfacher therapeutischer Dosis behandelt worden waren, neben der schon erwähnten Niederschlagsbildung regelmäßig Thrombozytenaggregationen gefunden. Eine Erklärung dafür wäre eine Art von Klumpungsreaktion der Thrombozyten im Rahmen der Phagozytose, worauf auch HIRSCH (24) hingewiesen hatte.

Die Zusatzversuche mit anderen Medikamenten, die ebenfalls zur antirheumatischen Therapie eingesetzt werden, führten, nach Applikation der jeweiligen zehnfachen therapeutischen Dosis im Einmaltest, nicht zu Ergebnissen, die vergleichbar mit denen gewesen wären, die nach Chloroquinbehandlung erzielt wurden.

7. Zusammenfassung

Die Wirkung von Chloroquin (Resochin^R) wurde an den neutrophilen Granulozyten von zehn gesunden Probanden in seiner therapeutischen, fünffachen und zehnfachen therapeutischen Dosis mit in vitro Versuchen geprüft. Es stellte sich eine dosisabhängige Hemmung der Phagozytose, die durch den Phagozytoseindex, die Zahl und den Zustand der phagozytierten Enterokokken deutlich meßbar wurde, heraus. Die Granulierung der untersuchten Zellen veränderte sich unter der Medikamenteneinwirkung nicht in der Hinsicht, daß eine Lysosomenstabilisierung anzunehmen war. Es ergaben sich auch nur geringe Differenzen in der Granulierung zwischen phagozytierenden und nicht-phagozytierenden Granulozyten. Der Einfluß des pH-Wertes auf die Chloroquinwirkung wurde diskutiert. Die eigenen pH-Messungen ergaben keine bedeutenden pH-Verschiebungen.

Als Nebentbefund wurde auf die Thrombozytenaggregation und die Bildung von Heparin-Chloroquin-Komplexen hingewiesen, und mögliche Ursachen diskutiert.

Die Prüfung anderer, zur antirheumatischen Therapie benutzten Medikamente führte nicht zu mit Chloroquin vergleichbaren Ergebnissen.

Die Hemmung der Phagozytose der neutrophilen Granulozyten wurde in klinischen Bezug zu rheumatoider Arthritis und ähnlichen Erkrankungen gesetzt und erörtert.

8. Literaturverzeichnis

1. ABRAHAM, R., RINGWOOD, N.
Effects of lysosomotropic agents on the hepatic uptake and storage of degraded carrageenan.
Exp. Molec. Path., 26 (1977) 13-27
2. ALTENÄHR, E., KRACHT, J.
Lysosomen und ihre Bedeutung für die Pathologie.
Dtsch. med. Wschr., 44 (1976) 1620-1624
3. ANTERHOFF, H.
Lehrbuch der pharmazeutischen Chemie. 6. erweit. Aufl.
Wissenschaftl. Verlagsges. mbH, Stuttgart (1971) S. 404
4. BACHMANN, F., HARTL, W.
MK-231 (Sulindac) in der Behandlung der rheumatoiden Arthritis.
Dtsch. med. Wschr., 48 (1977) 1772-1775
5. BAKER, D.J., TRIST, D.C., WEATHERALL, M., BECKENHAM, U.K.
Inhibition of phagocytosis by mepacrine.
Brit. J. Pharmacol., 56 (1976) 346-347
6. BECKER, E.L., WARD, P.A.
Partial biochemical characterization of the activated esterase required in the complement-dependent chemotaxis of rabbit polymorphonuclear leukocytes.
J. exp. Med., 125 (1967) 1021-1030
7. BEGEMANN, H.
Klinische Hämatologie.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1970) S. 69-70
8. BERGMAYER, H.U.
Methoden der enzymatischen Analyse. Band II, 2. Aufl.
Verlag Chemie, Weinheim (1970) S. 1136
9. BUDDECKE, E.
Grundriss der Biochemie. 4. Aufl.
De Gruyter Lehrbuch, Berlin-New York (1974) S. 189, 396

10. CHANG, Y.H.
Studies on Phagocytosis. II. The effect of nonsteroidal antiinflammatory drugs on phagocytosis and on urate crystal- induced canine joint inflammation.
J. Pharmacol. Exp. Ther., 183 (1972) 235-244
11. COLLINS, G.
Chloroquin as prostaglandin antagonist in treatment of patent ductus arteriosus.
Lancet II, Nr. 9 (1976) 810
12. DI DONATO, S., WIESMANN, U.N., HERSCHKOWITZ, N.
Membrane adsorption and internalization of [^{14}C]chloroquin by cultured human fibroblasts.
Biochem. Pharmac., 26 (1977) 7-10
13. EDER, M., GEDIGK, P.
Lehrbuch der allgemeinen Pathologie und der pathologischen Anatomie. 29. Aufl.
Springer-Verlag, (1974) S. 172, 748-749
14. ELKO, E.E., CANTRELL, W.
Nonspecific phagocytic activity in rats infected with plasmodium berghei and treated with amodiaquine or chloroquine.
Am. J. Trop. Med. Hyg., 19 (1970) 899-904
15. ELSBACH, P., STEINMETZ, P.R., BALKO, C.
On the interaction between phagocytes and micro-organisms.
N. Engl. J. Med., Nr. 18 (1973) 846-852
16. FISCHER, V.W.
Affinity of chloroquin for bone.
J. Pharm. Pharmac., 27 (1975) 527-529
17. FORSDYKE, D.R.
Evidence for a relationship between chloroquin and complement from studies with lymphocyte mitogens: possible implications for the mechanism of action of chloroquin in disease.
Can. J. Microbiol., 21 (1975) 1581-1586

18. FRIMMER, M.
Biologische Grundlagen pharmakologischer Wirkungen.
Schattauer-Verlag, Stuttgart (1971) S. 270
19. GANONG, W.F., AUERSWALD, W.
Lehrbuch der medizinischen Physiologie. 3.neub.u.erw.Aufl.
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1974) S.679
20. GREILING, H.
Die turbidimetrische Bestimmung von Sulfomucopolysacchariden mit Resochin.
Z. Rheumaforsch., 20 (1961) 17-21
21. GRUNDMANN, M., BAYER, A.
Effects of chloroquin on the adrenocortical function.
Arzneim. Forsch., 26 Nr.11 (1976) 2029-2035
22. HART, P.D.A., YOUNG, M.R.
Interference with normal phagosome-lysosome fusion in macrophages, using ingested yeast cells and suramin.
Nature, 256 (1975) 47-49
23. HERRLER, R., WINKLER, H.G.
Chemie - Tabellen. 2. Überarb. Aufl.
Aulis-Verlag Deubner u.Co, Köln (1970) S. 55, 106, 108
24. HIRSCH, J.G., COHN, Z.A.
Degranulation of polymorphonuclear leucocytes following phagozytosis of microorganisms.
J. exp. Med., 112 (1960) 1005-1014
25. HOLTZ, G., MANTEL, W., BUCK, W.
The inhibition of antigen-antibody reactions by Chloroquin and its mechanism of action.
Z. Immun. Forsch., 146 (1973) 145-157
26. HOMEWOOD, C.A., WARHURST, D.C., PETERS, W., BAGGALEY
Lysosomes, pH and the anti-malarial action of chloroquin.
Nature, 235 Nr.7 (1972) 50-52
27. HUSMANN, F.
Was leistet die Rheumatherapie?
Therapiewoche, 46 (1977) 8362-8368

28. JULKUNEN, H., ROKKANEN, P., LAINE, H.
Chloroquin treatment and bone changes in rheumatoid arthritis.
Scand. J. Rheumatology, 5 (1976) 36-38
29. KLEIN, G., WOTTAWA, A.
Der Einfluß sogenannter Basistherapeutika und symptomatisch wirksamer Antirheumatika auf Enzyme der DNA-Synthese und DNA-Reparatur.
Acta Med. Austriaca, 4 (1975) 153-156
30. KLINEFELTER, H.F., ACHURRA, A.
Effects of gold salts and antimalarials on the rheumatoid factor in the rheumatoid arthritis.
Scand. J. Rheum., 2 (1973) 117-182
31. KOLLEGIUM BIOMATHEMATIK NW
Biomathematik für Mediziner. 2. verbesserte Aufl.
Springer-Verlag, B.-H.-N.Y. (1976) S. 3, 11, 158-160,
S. 169, 176-178
32. KUSCHINSKY, G., LÜLLMANN, H.
Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie. 6. überarb. u. erw. Aufl.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1974) S. 115, 228
33. LAAKSONEN, A.L., KOSKIAHDE, V., JUVA, K.
Dosage of antimalarial drugs for children with juvenile rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematoses.
Scand. J. Rheumatology, 3 (1974) 103-108
34. LEVIN, K., THOMASSON, B.
Leucocyte stimulation by autohomogenate in systemic lupus erythematoses measured with flow microcalorimetry.
Acta Med. Scand., 195 (1974) 191-200
35. MANKU, M.S., HORROBIN, D.F.
Chloroquine, quinine, procaine, quinidine and clomipramine are prostaglandin agonists and antagonists.
Prostaglandins, 12 Nr.5 (1976) 789-801
36. MATHIES, H.
Medikamentöse und physikalische Therapie der chronischen Polyarthrititis.
Internist. Praxis, 15 (1975) 375-381

37. MØLLER, K.O.
Pharmakologie. 4.ergänzte Aufl.
Benno Schwabe & Co Verlag, Basel-Stuttgart (1961) S. 139
38. MOWAT, A.G., BAUM, J.
Chemotaxis of polymorphonuclear leukocytes from patient
with rheumatoid arthritis.
J. Clin. Invest., 50 (1971) 2541-2549
39. NIETHAMMER, D., WILDFEUER, A., KLEIHAUER, E., HAFERKAMP, C.
Granulocyten dysfunktion, I. angeborene Störungen.
Klin. Wschr., 53 (1975) 643-652
40. NIETHAMMER, D., WILDFEUER, A., KLEIHAUER, E., HAFERKAMP, O.
Granulocyten dysfunktion, II. erworbene Störungen
Klin. Wschr., 53 (1975) 739-746
41. PHARM & MEDICAL INFORM
Rheumatische Erkrankungen.
Programmed^R-System, Frankfurt/M. (1977) S. 28-29, 35
42. PIPER, W.
Innere Medizin.
Springer-Verlag, B.-H.-N.Y. (1974) S. 153-155
43. POLET, H., BARR, C.F.
Uptake of Chloroquine-3-H³ by plasmodium knowlesi in vitro.
J. Pharmacol. Exp. Therap., 168 (1969) 187-192
44. POPERT, A.J.
Chloroquine: a review.
Rheumatol. Rehabil., 15 (1976) 235-238
45. REIJNGOUD, D.J., TAGER, J.M.
Chloroquine accumulation in isolated rat liver lysosomes.
Febs Letters, 64 Nr.1 (1976) 231-235
46. RINDLER, L., BRAUNSTEINER, H.
Biochemie der Granula myeloischer Zellen unter physiolo-
gischen und pathophysiologischen Bedingungen.
Dtsch. med. Wschr., 1 (1977) 24-27

47. ROTTER, W.
Lehrbuch der Pathologie. Band II, UTB 503
Schattauer-Verlag, S.-N.Y. (1975) S. 159, 162-163
48. RÜTER, R.
Die Wirkung von DNCG auf Granulocytenmembranen.
Diss. Univ. München (1977)
49. RYSER, H.L.P.
The uptake of foreign proteins by mammalian cells
and the function of pinocytosis.
Bull. Schweiz. Akad. Med. Wiss., 24 (1969) 363-385
50. SACHS, L.
Statistische Auswertungsmethoden.
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1968) S. 68
51. SACHS, L.
Angewandte Statistik.
Springer-Verlag, B.-H.-N.Y. (1974) S. 244-246, 422-429
52. SCHEIBE, G., MAREIS, A., ECKER, H.
Über reversible Polymerisation als Ursache neuartiger
Absorptionsbanden (III).
Naturwiss., 29 (1937) 474-475
53. SCHEIBE, G.
Reversible Polymerisation als Ursache neuartiger
Absorptionsbanden von Farbstoffen.
Kolloid-Zschr., 82 (1938) 1-14
54. SCHEIBE, G., ZANKER, V.
Physikochemische Grundlagen der Metachromasie.
Acta histochem., Suppl.I (1958) 6-37
55. SIEGENTHALER, W.
Klinische Pathophysiologie. 3.überarb.u.erweit. Aufl.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1976) S. 544
56. SIEGMETH, W.
Komplikationen unter Chloroquintherapie.
Acta Med. Austriaca, 4 (1975) 116-121

57. SMITH, R.J., BLOOMFIELD, N.J.
Effect of prostaglandins (PG) and nonsteroid anti-inflammatory agents (NSAIA) on phagocytosis by and lysosomal enzyme secretion from guinea-pig neutrophils.
Pharmacologist, 18 (1976) 225
58. SMITH, R.J., BLOOMFIELD, N.J.
Modulation of phagocytosis by and lysosomal enzyme secretion from guinea-pig neutrophils: effect of non-steroid antiinflammatory agents and prostaglandins.
J. Pharmacol. Exp. Ther., 200 (1977) 647-657
59. SUSCKE, J., GSCHWIND, K., RODE, G.
Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis saurer Mucopolysaccharide in menschlichen Blut- und Knochenmarkzellen.
Klin. Wschr., 54 (1976) 289-290
60. SYURIN, A.A., SKOROBATSKY, V.S.
Effect of quinoline derivates on the condition of phagocytosis in patients with Rheumatism.
Terapevt. Arkh., 47 (1975) 78-81
61. THIEL, H.J., PÜLHORN, G.
Klinik und Pathologie der Resochin^R-Einlagerung in die Hornhaut.
Klin. Mbl. Augenheilk., 166 (1975) 791-797
62. TRNAVSKA, Z., TRNAVSKY, K.
Influence of nonsteroidal antirheumatic drugs on collagen metabolism in rats with adjuvant-induced arthritis.
Pharmacology, 12 (1974) 110-116
63. TYMPNER, K.D., KLOSE, P.K., JANKA, G.
Einfluß intravenös verträglicher Immunglobuline auf die Phagozytose-Leistung der Granulozyten in vitro.
Münch. med. Wschr., 120 Nr.8 (1976) 251-252
64. VOLM, M., KAUFMANN, M. MATTERN, J.
Gezielte Tumor-Chemotherapie durch Onkobiogramme.
Dtsch. Med. Wschr., 99 (1974) 38-43

65. VOLM, M., KAUFMANN, M., MATTERN, J., WAYSS, K.
Möglichkeiten und Grenzen der prätherapeutischen Sensibilisierung von Tumoren gegen Zytostatika im Kurzzeittest.
Schweiz. med. Wschr., 105 (1975) 74-82
66. WELLHÖNER, H.H.
Allgemeine und systematische Pharmakologie und Toxikologie. 2.überarb. Aufl.
Springer-Verlag, B.-H.-N.Y. (1976) S. 372-373
67. WIESMANN, E.
Medizinische Mikrobiologie. 3.überarb.u.erweit. Aufl.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1974) S. 60, 366-367
68. WIESMANN, U.N., DI DONATO, S., HERSCHKOWITZ, N.N.
Effect of chloroquine on cultured fibroblasts: release of lysosomal hydrolases and inhibition of their uptake.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 66 (1975) 1338-1343
69. WINDHORST, D.B., LORINCZ, A.L.
Sulfone effects on leucocyte function and metabolism.
J. Lab. Clin. Med., 78 (1971) 850

Lebenslauf

- 8.1.1951 als erstes von zwei Kindern des Arno Pöhlmann und seiner Ehefrau Liselotte, geb.Stellmach in München geboren.
- 1957-61 Volksschulbesuch in München.
- 1961-70 Weiterbildung am Sophie-Scholl-Gymnasium in München mit Absolvierung des Abiturs.
- 1970-73 Ausbildung als medizinisch-technische Assistentin und Examen an der Walner-Schule in München. Praktikum in der biologischen Abteilung der Gesellschaft für Umwelt- und Strahlenforschung in Neuherberg bei München.
- 1973-74 Anstellung als medizinisch-technische Assistentin im klinisch-chemischen Labor des städtischen Krankenhauses Neuperlach in München.
- 1974-76 vorklinisches Medizinstudium in München.
- 1976-78 klinische Semester mit Absolvierung des ersten Teiles des Staatsexamens und Famulaturen in einer Allgemeinpraxis und bei der betriebsärztlichen Dienststelle der Firma Siemens in München.
- 1978-80 zweites Staatsexamen und Praktisches Jahr auf der chirurgischen und internistischen Abteilung des Krankenhauses Neuperlach, sowie im Fach Pädiatrie in der Poliklinik der Universität. Im Oktober 80 letzter Teil des Staatsexamens.

